

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Física I



TESIS DOCTORAL

**Inserción del complejo de traslocación de ADN del virus bacteriófago
"phi"29 en membranas lipídicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lara Hernández Moleiro

Director

Francisco Monroy Muñoz

Madrid, 2014

**Departamento de Química Física I
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid**

INSERCIÓN DEL COMPLEJO DE TRANSLOCACIÓN DE ADN DEL VIRUS BACTERIÓFAGO *phi29* EN MEMBRANAS LIPÍDICAS

**Memoria para la obtención del Grado de Doctor
Presentada por Lara Hernández Moleiro
Dirigida por Francisco Monroy Muñoz**

Madrid, 2013

A Paquito...

Agradecimientos

Como toda tesis, no hubiese sido posible si no es por el apoyo de todas las personas que he tenido alrededor, las cuales, gracias a Dios, han sido unas cuantas (por lo que seguro que dejo atrás a alguna en estos agradecimientos, no me lo tengáis en cuenta).

En primer lugar, por supuesto, quiero agradecer a mi director de tesis, Paco; pero este agradecimiento, no me gustaría que constase como algo típico para cumplir con el director, sino como un agradecimiento real. Sin tu ayuda, nada de esto hubiese sido posible, creíste en mí para empezar este camino y me has ayudado constantemente a lo largo de todo el tiempo, tal como dice mi hermana científica y gran amiga (Lauri), para nosotras eres nuestro padre científico (y con ello también se incluye alguna que otra discusión "necesaria").

Tras Paco, se encuentran todos los que sois y habéis formado el grupo de "Membranas Biológicas y Bio-Reología". Por supuesto, Iván, nuestro post-doc y el físico más biológico que nunca he conocido, mi hermana científica mayor, Lauri, que aunque llevemos ya unos años separadas, no dejo de admirarte como buena hermana pequeña; a Ruddi, mi cubano de pocas palabras (y punto); las chicas del lab (Silvi y Eli), por aguantarme todos los días con mis historias y prisas y convertiros en grandes amigas, se os quiere mozas; mi compi de despacho (Mike), por ser también algo más que eso, qué paciencia tienes a veces para poder aguantarme. Pero sobre todo, porque no sois solo compañeros, sino amigos. A Thomas, por permitirme hacer la mejor y única estancia de toda mi vida, al igual que toda la gente fantástica que conocí allí, la cual fue mucha, pero sobre todo a mi brother Nico.

Tras mi familia profesional, como no, he de agradecer a toda la gente ha tenido la suerte o la desgracia de soportarme durante algún periodo de este largo (y cuando digo largo, me refiero a muy largo) camino. En primer lugar, a Yoli (Paco), por preocuparte por mí y hacerme sentir como un miembro más de tu familia. A mis compis del depar, aunque he de agradecer históricamente, a los primeros que me apadrinaron cuando llegué, y de esto ya ha llovido mucho... Arman (mi popero preferido), Edu (la persona más buena y con más memoria que conozco), Alber (me encantan tus chistes, porque aunque los momentos sean malos, siempre tienes una sonrisa), Lauri (mi sister, si esque no dejas de aparecer en estos agradecimientos), Laura (y aunque no te guste... Boni... porque tú no has dejado de desaparecer en todos este tiempo y no has dejado de darme consejos, cada vez que creo que ya no vienes, haces chás y apareces a mi lado), Anita (la orgánica más quífica); Mario (otro físico venido a Biólogo) y como no Martita (que al igual que Boni, tú también sigues a mi lado, por todas esas tardes noches que acabamos coincidiendo por casualidad).

A todos los que llegasteis después y no por ello menos importantes; a mi "Bizarre Love Triangle" (No la versión de *New Order*, mejor la de *Temple*), no hace falta que de nombres, aunque hayamos tenido problemillas (ya resueltos), en el fondo os quiero muchísimo; a Diego, el Sr. de las Montañas, eres muy noble; a Ramí, por todas esas charlas y debates, me encanta hablar contigo; a Anita, por todos tus desayunos y momentos; a Moni, que aunque no empezásemos con el mismo pie, terminamos andando al mismo compás; a MJ, por todos los momentos de desesperación compartidos; a Jacobo, eres un gran chico, espero que volvamos a encontrarnos; a Nacho, mi inorgánico favorito, gracias por nuestros momentos; a Sarita, lo poco que conocí me gustó; a Mac, mis respetos; y a todos los que habéis ido llegando después y he tenido el gusto de conocer; Palomáin, porque los encuentros sorpresa en el pasillo; Yoli, un gusto haberte conocido, me encantan nuestras discusiones; Vicente y Alvaro, parte del aire fresco del depar; A Marisimu, que aunque tengamos más y menos, somos también family y claro, también a Richard, porque quien no cae rendida a los pies de un galán andaluz.

Por supuesto, también a Lufi y al Ruben, gracias por todo chicos, sobre todo por vuestros consejos y algunos de esos grandes viernes.

A toda la gente que he tenido el gusto de conocer durante estos años, a Ileana, mi compañera de correderas; Eli, por todas las tardes de experimentos; a Rebe, qué haría yo sin ti, 1000 gracias.

A mis amigos de fuera de la ciencia, tanto los de la uni, como los de la asociación y demás lugares, porque todos habéis aguantado alguno de mis estreses y habéis soportado mis desapariciones. (Dentro de estos, sobre todo a Miriam, que aunque no esté tanto contigo sabes que te quiero y como no, Garreth, mi pequeño irlandés☺).

A Larika, por supuesto... mi gran compañera y hermana (no de sangre, pero como si lo fuésemos), porque desde que nos hemos conocido has estado a mi lado. Nunca pensé que se pudiese tener una amistad tan grande con alguien.

Y por último, y no por ello menos valorado, a mi familia, porque de verdad que sin ellos nada de esto habría sido posible; tengo la suerte de contar con el apoyo de la que es para mí la mejor familia del mundo... la MÍA.

A mis tíos, primos, abuela, hermanos, Merce, padres y sobre todo a mis niños, Luis, Paola, Tere y Guille (hasta el momento), porque gracias a vosotros sé lo que es tener alegría por hacer las cosas y ver el mundo con la naturalidad que se merece.

Os quiero.

ÍNDICE

ABSTRACT

Insertion of the DNA translocation complex from the <i>ph29</i> virus bacteriophage in lipid membranes	1
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

INTRODUCCIÓN

1. Bionanotecnología	11
1.1 La Evolución Natural de la nanotecnología	11
1.2 En busca de aplicaciones.....	14
2. Membranas biológicas	19
2.1 Introducción	19
2.1.1 Historia	23
2.1.2 Composición de la Bicapa Lipídica: Fosfolípidos y otros	23
2.1.3 Modelo de Bicapa Curvada: Vesículas.....	27
2.2 Propiedades mecánicas de membranas	29
2.2.1 Fluctuaciones térmicas:	31
2.2.2 Espectro de fluctuaciones:	32
2.2.3 Dinámica de membranas:	34
2.2.4 Acoplamiento entre monocapas.....	34
2.2.5 Funciones de autocorrelación.....	36
2.2.6 Fluctuaciones de forma de vesículas esféricas: Factor de estructura dinámico	37
2.2.7 Efectos mecánicos de la permeabilidad en membranas	41

3. Virus Bacteriófagos	45
3.1 Historia y Diversidad:	45
3.2 Virus bacteriófago phi29	47
3.2.1 Morfogénesis	47
3.2.2 Conector	49
3.2.3 Localización y posible papel de la pRNA	50
3.2.4 Localización y función de la ATPasa p16	50
3.2.5 Movimiento del conector	51
<u>OBJETIVO</u>	61
Estrategia de compatibilización	62
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	71
3.1 Reactivos	71
3.1.1 Soluciones tamponadas empleadas	71
3.1.2 Lípidos	71
3.2 Purificación y marcaje de anticuerpos	73
3.3 Expresión y purificación de proteínas	73
3.4 Elaboración de vesículas (LUVs y GUVs)	76
3.4.1 Preparación de liposomas (LUV's)	78
3.4.2 Preparación de vesículas gigantes unilamelares (GUV's)	79
3.4.3 Ensamblaje de pRNA y gp16 en vesículas gigantes	81
3.5 Ensayos bioquímicos	82
3.5.1 Separación en gradientes discontinuos de densidad	82

3.5.2 Caracterización lipídica por fluorimetría.....	85
3.5.3 Caracterización proteica mediante Western-Blot	86
3.6 Técnicas microscópicas.....	87
3.6.1 Microscopía Óptica	87
3.6.1.1 Estudios de fluctuaciones de membrana en GUVs.	88
3.6.1.2 Experimentos de aspiración con micropipetas.....	91
3.6.1.3 Estudios de pérdida selectiva por tamaño en GUVs (Microscopía óptica de fluorescencia).	93
3.6.1.4 Caracterización de vesículas gigantes con p10 mediante inmunofluorescencia.	94
3.6.2 Microscopía confocal.....	95
3.6.2.1 Estudios de pérdida selectiva por tamaño en LUVs	96
3.6.3 Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM)	97
3.6.4 Criomicroscopía electrónica de transmisión.....	100
3.7 Técnicas de dispersión de Luz.....	101
3.7.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)	104
3.7.2 Espectroscopia spin-eco de neutrones (NSE)	106
<u>RESULTADOS</u>	115
4.1 Interacción lípido-proteína	116
4.2 Detección mediante inmunofluorescencia.....	119
4.3 Resultados de los test de permeabilidad	121
4.3.1 Resultados de pérdida selectiva de tamaño en LUVs	121

4.3.2 Conexión por poros de membrana entre compartimentos internos.....	124
4.3.3 Cinéticas de permeabilidad a calceína en GUV's.....	126
4.3.4 Cinéticas de permeabilidad a rodamina-dextrano en GUV's.....	130
4.4 Caracterización mediante Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM).....	132
4.5 Análisis mecánico.....	137
4.5.1 Estudios de aspiración con micropipetas.....	137
4.5.2 Estudios de fluctuaciones de membrana.	140
4.5.3 Consecuencias de la incorporación de p10 en la dinámica de las fluctuaciones membrana.....	145
4.5.4 Permeabilidad microscópica: estudio por NSE a altos vectores de onda	148
4.5.5 Estudios de permeabilidad en gradientes osmóticos	149
4.6 Integración del resto de los componentes.....	153
4.6.1 Estudio de fluctuaciones de membrana de vesículas de DMPC/POPG/PAzPC en presencia de p10 y pRNA.....	155
4.6.2 Estudio de la dinámica de fluctuaciones de vesículas de DMPC/POPG/PAzPC en presencia de p10 y pRNA.....	156
4.6.3 Estudios de la dependencia de la dinámica de las fluctuaciones en función de la viscosidad para vesículas de DMPC.	159

4.6.4 Estudios de la dinámica de fluctuaciones en vesículas de DMPC/POPG/PAzPC a concentración 2M (sacarosa-glucosa) en presencia de p10.	161
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

4.6.5 Sistema completo: Fluctuaciones activas en presencia de la maquinaria completa con actividad ATP-asa.	163
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<u>CONCLUSIONES</u>	171
----------------------------------	------------

ARTÍCULOS	173
------------------------	------------

Insertion of the DNA translocation complex from the *phi29* virus bacteriophage in lipid membranes

ABSTRACT

The aim of this thesis was to construct a DNA compactor machine capable of translocating DNA inside lipid vesicles. To do this, we used a DNA packaging machine that is able to translocate the DNA during the morphogenesis of the *phi29* virus [1]. The portal connector of bacteriophage viruses consists of a robust molecular machine for DNA translocation. In this thesis we propose an optimized reconstitution method for efficient orthogonal integration of native viral connectors (in particular, of giant unilamellar vesicles) into lipid bilayers. Our nanoengineering plan considers the hydrophilic connector protein of the *phi29* bacteriophage virus integrated into a specifically engineered bilayer made of “hydrophylized” lipids. From the precise knowledge of the connector structure, the membrane chemistry was designed by tuning reactivity in the bilayer using specific functional lipids. We include details of the reconstitution methods and experimental biophysical results concerning the integration of the portal protein in the engineered membrane. The proposed route provides an efficient method for orthogonal integration of native viral connectors into lipid bilayers in conditions that are suitable for functional DNA translocation. This concept could be potentially exploited in advanced nanotechnological procedures, particularly for the integration of these powerful machines into giant lipid vesicles with the aim of building a cargo-device useful for gene delivery applications [2].

STRATEGY

The proposed route provides an efficient method for orthogonal integration of native viral connectors into lipid bilayers in conditions that are appropriate for functional DNA translocation. From the precise knowledge of the connector structure, we were able to construct an adapted chemistry membrane that is compatible with these surfaces [3]. We chose oxidized lipids with carboxylic groups in one of the tails (PAzPC) to react with lateral groups from arginine amino acids and we also used

negative charged lipids in the head (POPG) to interact with hydrophobic and positive environments. To construct a vesicle-like scaffold, we used two kinds of neutral lipids in this thesis, the first of which was DOPC and the second of which was DMPC (to reduce the membrane thickness and improve the assembly of the rest of the components in the DNA packaging machine).

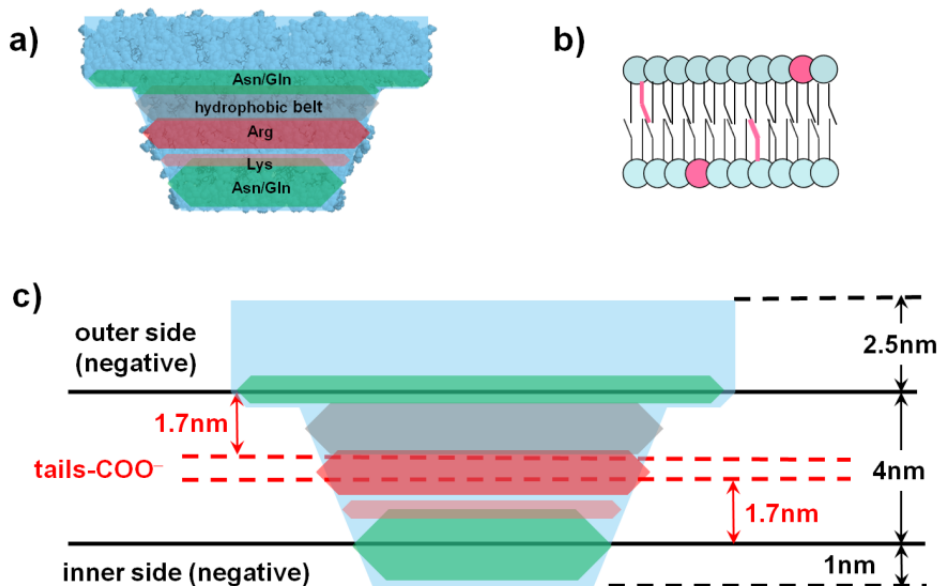


Figure 1. Architectural description of the lipid-*p10* protein membrane assembly. (a) Surface chemistry of *p10* connector: highly hydrophobic belt for adhesive interaction with lipid tails (in gray); equatorial arginine and lysine residues for reactive interaction with PAzPc (in red); distal cationic belts (Asn/Gln at pH 8) for electrostatic coupling with the negatively charged membrane surface (in green). (b) Lipid bilayer: The lipid component is based on DOPC (blue heads) mixed with the functional oxidized lipid PAzPC (10% mol; red tails) and the anionic lipid POPG (10% mol; red heads). (c) Protein-lipid membrane complex: the lipid bilayer is 4 nm thick, with the functional carboxylate groups ($-\text{COO}^-$) of PAzPc dangling 1.7 nm below the membrane surface. The anionic lipid (POPG) endows net negative charge to both surfaces. The surface groups in the native *p10* protein interact with the modified bilayer at different levels: (i) electrostatic counterbalance Asn/Gln-POPG at the membrane surface; (ii) hydrophobic matching at the near-surface hydrophobic core; (iii) Arg(/Lys)-PAzPc amidation at the intermonolayer region.

METHODS

We use Large Unilamellar Liposomes (LUVs) and Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) to demonstrate the protein integration. LUVs were prepared by the extrusion method from mixtures of the three different lipids (DOPC/DMPC, POPG and PAzPC) in a molar ratio of 80:10:10. The lipids were dissolved in chloroform. This solution was later dried under a nitrogen stream to form a lipid film. Then, the film was hydrated by vortexing and further resuspension in a buffer at 1 mg/mL total lipid concentration. The resulting multilamellar suspension was extruded through a polycarbonate membrane with 1 μ m nominal pore diameter (Avestin, Germany). After 21 extrusion cycles, LUVs were obtained at high concentration and relatively low size polydispersity. For protein incorporation, p10-lipid proteo-LUVs are formed by co-extrusion of the lamellar suspension with the protein solution. The protein was added during the hydration step before extrusion. Finally, LUVs (or proteo-LUVs) are concentrated at 10 mg/mL (45,000 rpm; 4°C, 1h). From these LUVs, we prepared GUVs by the electroswellling method [4]. 10 μ L of LUV buffer dispersion (10 mg/mL total lipid) was briefly spread over an ITO (indium tin oxide)-coated glass slide. The fabrication chamber is composed of two parallel slides separated by a Teflon spacer (1 mm thickness). After solvent evaporation, the film was rehydrated with a sucrose solution (208 mM). The chamber was then connected to an AC power supply (1.1 V, 8 Hz; 90 min).

To characterize integration into the bilayer, we used different techniques: sucrose gradients, labeled-antibody recognition, permeability through pores of different fluorescent size-dependent probes, Atomic Force Microscopy (AFM), Electronic Cryomicroscopy (Cryo-TEM). We also study the effects of this integration in the dynamics of the membrane during thermal fluctuations by micropipette techniques, flickering microscopy and Neutron Spin Echo (NSE).

RESULTS

Characterization experiments:

Sucrose gradients and Western-Blot: From sucrose gradient separations, we were able to study the composition of the lipid membrane by Western-Blotting. We observed that the use of oxidized lipids improves the protein-membrane interaction.

Labeled-Antibody protein recognition: Once the correct lipid composition was chosen, we detected the presence of these proteins around the outer side of the vesicle membranes using antibodies labeled against *p10*.

Permeability Tests: To check the orthogonal position of *p10* inside the bilayer, we studied the permeability of these pores with different fluorescent probes.

We used a hydrophobic fluorescent probe (FM1-43) which is only excited in hydrophobic environments and which is unable to cross the bilayer [5]. Therefore, we used oligomellar vesicles to study passage through the *p10* pores. In this study, we observed how the probe was able to permeate across the pores and stain the inner bilayers when the *p10* protein was situated in the bilayer. In the absence of *p10*, the probe only stained the outer bilayers of these vesicles. (See Figure 4.4 in the results chapter).

A further study focused on size-dependent permeability. We used giant and large unilamellar vesicles with two different sized fluorescent probes in the presence and in the absence of *p10*. The smaller probe (calcein) was able to cross the pores formed by *p10* but the larger (rhodamine-dextran) was not able to pass through these channels. We used confocal microscopy to carry out the experiments with LUVs and optical fluorescence microscopy for those with GUVs. In the latter case, we were also able to study the kinetics of the process and determine whether *p10* is conserved in the bilayer (assuming suitable conditions) during the reconstitution of LUVs to form GUVs. We also observed that the presence of oxidized lipids in the bilayer improves the permeation velocity through these pores and, therefore, it can be said that the integration of *p10* in these membranes was higher. (See Figure 4.3 for LUV experiments performed using confocal microscopy and Figures 4.(5-7) for GUV experiments carried out using fluorescence optical microscopy in the results chapter).

Atomic Force Microscopy (AFM) [6, 7]: Using this technique we characterized both the proportion of *p10* inserted into the bilayer and its orientation. We observed that the extent of incorporation is approximately 75% and that there is not a preferred orientation for this incorporation. (See Figure 4.10). We were also able to confirm that the height of the bilayer membrane is approximately 4 nm. (See Figure 4.8).

Once we achieved the correct incorporation of *p10* in the membrane, we studied the mechanical effect of this integration by detecting the influence of the protein on the dynamics of the shape fluctuations of the vesicle.

Micropipette techniques [8, 9]: Through this technique we studied giant vesicles in the presence and in the absence of $p10$. We observed that when $p10$ is present in the membrane the tensional mode of the vesicles is relaxed with respect to that of the bare vesicles (without pores integrated in their membranes). Also, we observed that the presence of $p10$ decreases the bending modulus in these membranes: we obtained a value for the bending modulus of the adapted membrane of about $6,5 K_B T$ which, upon inclusion of $p10$, falls to approximately $2 K_B T$ (see Figure 4.12).

Flickering Microscopy [10-13]: Using this technique, we studied the effect of water permeability through the $p10$ pore on the dynamics of the membrane. We investigated the dependence of the fluctuations on the existence of an enhanced permeability provided by the $p10$ pores in different osmotic gradients. From these studies, we have quantified the permeability through these pores and have drawn conclusions with respect to the dependence of the permeability on pore density and osmotic gradient. We also demonstrated that the energy involved in this process is not dependent on the amount of protein present in these membranes.

This thesis concludes with a preliminary study of the assembly of the rest of the components of the packaging machinery. The same technique was used to study the assembly of the pRNA molecule with the observation that it does not greatly affect the permeability of the system; however, the assembly of the $gp16$ terminase and its biological fuel (ATP) show the largest influence on the permeability.

Neutron Spin Echo [14-16]: We also demonstrated the dynamic effects of the permeability by scattering techniques.

CONCLUSIONS

In this thesis we have demonstrated the viability of the synthetic incorporation of the DNA packaging machinery from the ϕ 29 virus bacteriophage in lipid vesicles. In the first part of this thesis, we have demonstrated the integration of the most important protein scaffold, $p10$, through characterization using different techniques and the resultant effect on the dynamics of the membrane. We also demonstrated the assembly of the rest of the components by studying its effect on the mechanics of the membranes.

BIBLIOGRAPHY

1. Meijer, W.J., J.A. Horcajadas, and M. Salas, *Phi29 family of phages*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(2): p. 261-87.
2. Moleiro, L.H., et al., *Efficient Orthogonal Integration of the Bacteriophage ϕ 29 DNA-Portal Connector Protein in Engineered Lipid Bilayers*. ACS Synthetic Biology, 2012. **1**(9): p. 414-424.
3. Guasch, A., et al., *Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage ϕ 29 connector particle*. Journal of Molecular Biology, 2002. **315**(4): p. 663-676.
4. Angelova, M.I., et al., *Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications*, in *Trends in Colloid and Interface Science VI*, C. Helm, M. Lösche, and H. Möhwald, Editors. 1992, Steinkopff. p. 127-131.
5. Parra, E., et al., *A combined action of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C modulates permeability and dynamics of phospholipid membranes*. Biochemical Journal, 2011. **438**(3): p. 555-564.
6. Binnig, G., et al., *Atomic Resolution with Atomic Force Microscope*. EPL (Europhysics Letters), 1987. **3**(12): p. 1281.
7. Engel, A. and D.J. Muller, *Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(9): p. 715-8.
8. Manneville, J.B., et al., *Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2001. **64**(2 Pt 1): p. 24.
9. Evans, E. and W. Rawicz, *Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes*. Phys Rev Lett, 1990. **64**(17): p. 2094-2097.
10. García, R., et al., *Bimodal Spectrum for the Curvature Fluctuations of Bilayer Vesicles: Pure Bending plus Hybrid Curvature-Dilation Modes*. Physical Review Letters, 2009. **102**(12): p. 128101.
11. Helfrich, W., *Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments*. Z. Naturforsch, 1973. **28**(11): p. 693-703.
12. Helfrich, W. and R.M. Servuss, *Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes*. Il Nuovo Cimento D, 1984. **3**(1): p. 137-151.
13. Reister-Gottfried, E., S.M. Leitenberger, and U. Seifert, *Hybrid simulations of lateral diffusion in fluctuating membranes*. Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics, 2007. **75**(1 Pt 1): p. 011908.
14. Arriaga, L.R., et al., *Stiffening Effect of Cholesterol on Disordered Lipid Phases: A Combined Neutron Spin Echo + Dynamic Light Scattering Analysis of the*

- Bending Elasticity of Large Unilamellar Vesicles*. Biophysical Journal, 2009. **96**(9): p. 3629-3637.
15. Arriaga, L.R., et al., *Dissipative curvature fluctuations in bilayer vesicles: Coexistence of pure-bending and hybrid curvature-compression modes*. The European Physical Journal E, 2010. **31**(1): p. 105-113.
 16. Hellweg, T., et al., *Shape fluctuations of microemulsion droplets: a neutron spin-echo study*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **183–185**(0): p. 159-169.

INTRODUCCIÓN

1. Bionanotecnología:

Se denomina bionanotecnología a aquella rama de la nanociencia y la nanotecnología centrada en el uso específico de moléculas biológicas tales como las proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, etc. para la construcción de estructuras artificiales basadas en interacciones biomoleculares. Por cuanto concierne a componentes biológicos dispersos o disueltos en fase acuosa, frecuentemente se reconoce a la bionanotecnología dentro de las nanotecnologías húmedas, por contraste a la nanotecnología más clásica la cual se corresponde a la ingeniería de nano-objetos inorgánicos. En particular, la recientemente denominada Biología Sintética es un nuevo nicho fronterizo entre la química de síntesis, la química física, la física biológica, la biología molecular y la biología celular, donde el biólogo sintético aplica los formalismos de la ingeniería en el diseño y construcción de nuevos componentes biológicos, dispositivos y sistemas con nuevas funciones, iguales, miméticas o completamente diferentes a las de los componentes biológicos de partida. Para ello, se apoya en herramientas de diferentes disciplinas altamente especializadas, tales como la ingeniería genética, bioingeniería, bioinformática y biología de sistemas, entre otras.

1.1 La Evolución Natural de la nanotecnología

El siglo XX es considerado como la época dorada en el campo de la tecnología, durante este tiempo, se desarrollaron con éxito muchos proyectos basados en la obtención de dispositivos artificiales, entre los cuales cabe destacar avances en campos tan diversos como la fabricación industrial, electrónica, automática, comunicaciones, transporte, telecomunicaciones, etc. Sin embargo, hemos debido esperar al comienzo del nuevo milenio para asistir el empleo generalizado de biomoléculas como elementos de construcción y los sistemas biológicos como herramienta en aplicaciones tecnológicas. Uno de los motivos de este retraso se debe a la complejidad de las interacciones a nivel molecular y al parcial desconocimiento de algunos de los mecanismos de interacción a nivel celular.

Hasta hace pocos años, la mayoría de estudios nanotecnológicos realizados en el ámbito biológico han estado enfocados en una visión reduccionista de los objetivos de estudio. Este enfoque, consistía en desentrañar el rompecabezas de las redes celulares complejas a partir de la información contenida en las diferentes partes que lo conformaban [1], provocando una acumulación de información de las partes aisladas. Gracias a la cantidad de información acumulada sin conexión con el resto de las redes, se fomentó la Biología de Sistemas, y su herramienta computacional, la Bioinformática, ambas nuevas disciplinas que combinadas son capaces de organizar la información acumulada y emplearla en un planteamiento más holístico al estudio del problema. De esta manera, el uso en Biología de las nuevas herramientas cuantitativas ha posibilitado el alcance de un nivel de comprensión más general, a escala de sistema, al tiempo que se han podido predecir sus propiedades en concordancia con la visión reduccionista, esto es la Biología de Sistemas. Esta visión holística, gracias a las similitudes encontradas entre algunos componentes biológicos con herramientas típicas de la ingeniería, ha fomentado el movimiento de algunos de los retos importantes de la investigación en biología de sistemas hacia ese nuevo campo de la ingeniería arriba mencionado, la Biología Sintética. (Ver Tabla 1) [2].

Hace pocos años, la definición ofrecida por la Organización Internacional de Biología Sintética (syntheticbiology.org) reza así: *“El diseño y la construcción de nuevas partes biológicas, artefactos y sistemas que todavía no existen en la naturaleza para propósitos útiles”*.

Actualmente, ofrece la posibilidad de estudiar la regulación celular y el comportamiento “*de novo*” usando redes, así como para aplicaciones en el campo de la medicina y la biotecnología [3] .

La bionanotecnología, o nanotecnología con biomoléculas y bioestructuras, ofrece grandes oportunidades a través de la creación y manipulación de estructuras plenamente funcionales en la escala nanométrica. Ese rango de tamaños, ha supuesto un reto importante tanto para la manipulación de objetos y sistemas, como para la aplicación de los conocimientos sobre moléculas y sistemas biológicos en busca de la construcción de nuevos sistemas basados en estrategias tecnológicas. El acercamiento a la escala se ha conseguido a través de dos tipos de vertientes comúnmente conocidas como enfoque de “arriba hacia abajo” ó “*top-down*”, en el cual, la producción se realiza mediante el empleo de recursos tecnológicos capaces de favorecer la manipulación de técnicas e instrumentos a estas escalas y el enfoque de “*abajo hacia arriba*” ó “*bottom-up*”, en el que el montaje de estas estructuras se produce por autoensamblaje molécula a molécula [4].

Tecnología	Función	Ejemplo biomolecular
Bigas, columnas	Transmisión de fuerzas, estabilidad estructural	Microtúbulos, celulosa
Cables	Transmisión de tensión	Colágeno
Sujeción, pegamento	Conexión	Fuerzas intermoleculares
Solenoides, actuadores	Movimiento	Cambios conformacionales, actina/miosina
Motores	Girar ejes	Motores flagelares
Ejes de acción	Torsión	Flagelo bacteriano
Rodamientos	Soportar partes móviles	Enlaces sigma
Contenedor	Conservar fluidos	Vesículas
Tubería	Conducir fluidos	Estructuras tubulares
Bombas	Mover fluidos	Flagelos, proteínas de membrana
Cintas transportadoras	Mover componentes	Ribosomas (análogo parcial)
Pinzas	Sostener piezas	Sítios de unión enzimática
Herramientas	Modificar piezas de trabajo	Grupos funcionales, complejos metálicos
Líneas de producción	Construcción de sistemas	Sistemas enzimáticos, ribosomas
Sistemas numéricos de control	Almacenar y leer información	Sistema genético

Tabla 1. Comparación entre componentes macroscópicos de la ingeniería y componentes biológicos. (Adaptación de “*Engines of Creation 2.0*”[5])

Historia

La primera aproximación hacia el concepto de nanotecnología se atribuye a mediados del siglo XX, cuando el premio Nobel de Física (1965), Richard P. Feynman, en la reunión anual de la Sociedad de Física Americana de 1959, realizó una intervención titulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom. An Invitation to Enter a New Field of Physics*”. En ella, resaltó la posibilidad de cambiar las escalas utilizadas hasta el momento en tecnología abriendo con ello un nuevo mundo de enormes expectativas, donde explorando la inmensidad espacial existente en la nanoescala se podrían comenzar a contemplar los sistemas biológicos como objetos y herramientas útiles para el desarrollo de una nueva nanotecnología.

Desde la introducción del concepto por parte de Feynman, muchos investigadores han intentado dar una definición más exacta del término *nanotecnología*; pero puede destacarse la definición propuesta en 1974 por Norio Taniguchi, donde se definió como:

“Nano-tecnología, principalmente consiste en el procesamiento de la separación, consolidación y deformación de los materiales a un átomo o una molécula”

Posteriormente, esta definición fue ampliada por el Prof. K. Eric Drexler en 1986, quien ha supuesto junto con las ideas de Feynman una de las contribuciones conceptuales más aceptadas por la comunidad científica. Desde ese momento, las ideas sugeridas han venido siendo extendidas hacia la *producción a gran escala* basándose en eventos ocurridos y procesos realizados desde la nanoescala [5, 6].

1.2 En busca de aplicaciones...

La investigación nanotecnológica ha producido hasta el momento muchas tecnologías con potenciales aplicaciones médicas, desde aquellas que explotan nuevas propiedades de sistemas inorgánicos, como los *quantum-dots*, nanocápsulas de oro, nanocompuestos y nanopartículas, sistemas orgánicos como los fullerenos, nanotubos de carbono, hasta las que hacen uso de objetos puramente biológicos, tales como proteínas, liposomas, o

estructuras basadas en la autorganización y el reconocimiento molecular de los polielectrolitos basados en ácidos nucleicos.

Aunque la mayor parte del trabajo se ha focalizado en el estudio de las propiedades moleculares de los ensamblajes elementales, muchas investigaciones actuales se han centrado en la construcción de dispositivos y maquinarias con el objetivo de crear entidades funcionales viables fuera de su entorno natural. Una vez conseguidos estos hitos, estas nanomáquinas fabricadas a partir de estructuras ordenadas, podrían ser explotadas en la fabricación de chips, sistemas de reconocimiento y transporte en asociación a nanopartículas, formación de sistemas nanoelectromecánicos (NEMS), sensores moleculares activables, sistemas ópticos, etc. [7, 8].

La administración de fármacos mediante estructuras basadas en componentes biotecnológicos está en continuo avance y día a día se están realizando refinamientos asociados a los mismos; el empleo de este tipo de estructuras ha sido una de las aplicaciones más revolucionarias ya que a través de estos sistemas biomiméticos se solventan problemas tales como la biocompatibilidad, la cual ha sido uno de los mayores problemas en los últimos años. Algunas de sus posibles aplicaciones en este campo pueden incluir el empleo de derivados capaces de detectar patógenos, diagnóstico de enfermedades, construcción sintética de orgánulos celulares, ensamblaje de tejidos a partir de nanomateriales, transporte de drogas o genes terapéuticos, etc.

Algunas de las características estructurales importantes a tener en cuenta para la construcción de un dispositivo ideal, deberían plantear los siguientes problemas[9]:

Cubierta

El diseño de la cubierta es uno de los pasos cruciales en el diseño de biomáquinas. Existen variedad de técnicas para su realización, tanto en la micro-escala como en la nano-escala. Asimismo, dependiendo de los materiales utilizados se pueden modular las propiedades de la misma. Entre los tipos más usuales, destaca el uso liposomas o vesículas formadas a partir de lípidos, y capsulas basadas en copolímeros dibloque, lípidos estabilizados por nanopartículas, polímeros estabilizados por nanopartículas, etc.

Las vesículas lipídicas, han sido muy estudiadas para la encapsulación y administración de fármacos por su similitud a la membrana celular y por la capacidad de modificación de los lípidos que la constituyen para adaptarlas a diferentes entornos. A pesar de estas grandes ventajas, uno de los puntos débiles de estas cápsulas, es su baja estabilidad, la

cual se encuentra en el rango de horas hasta pocos días. La formación de cubiertas híbridas entre componentes orgánicos e inorgánicos ha ayudado considerablemente a mejorar la estabilidad de estos objetos. Algunos de los compuestos inorgánicos utilizados para esta estabilización son los polielectrolitos, mediante la deposición lámina a lámina, y el recubrimiento con nanopartículas [10-12].

A parte de la estabilidad, uno de los aspectos importantes que debe poseer ésta cubierta, es la capacidad de evadir tanto el sistema innato, como el reconocimiento del sistema inmune del huésped, evitando ser destruida antes de su focalización. Entre las estrategias seguidas para este proceso, se encuentran también las nanopartículas funcionalizadas con glicosaminoglicanos, glicosilfosfatidilinositoles, receptores de citoquinas y moléculas conocidas por resistir la adsorción, tales como el polietilenglicol (PEG)[13].

Transporte de moléculas dentro y fuera del dispositivo.

A parte del encapsulamiento, un dispositivo ideal, debería ser capaz de facilitar el movimiento de los reactivos hacia el interior del dispositivo, pudiendo desencadenar una vez en el interior una reacción con algún otro reactivo previamente encapsulado, y expulsando tras el resultado de ello los productos hacia el exterior.

La creación de este tipo de compuertas en la cubierta (poros), no es algo trivial, muestra de ello puede observarse en el sistema *in vivo*, donde las células se abastecen de diferentes tipos de moléculas para el transporte a través de la membrana, así como de diferentes mecanismos para interiorizar y ordenar (procesos de endocitosis, pinocitosis, balsas lipídicas, etc.).

Entre las estrategias desarrolladas para la creación de estos poros, podemos destacar estrategias en transporte activo, como por ejemplo la proteína transmembrana transportadora de glucosa, GLUT1. Otro tipo de estrategias se basan en un transporte pasivo, el cual puede producirse como respuesta a algún estímulo, como por ejemplo la apertura de canal en la proteína α -hemolisina, la cual tras una exposición a la luz, sufre un cambio conformacional en su estructura permitiendo la difusión de moléculas a través de su canal interno (2 nm).

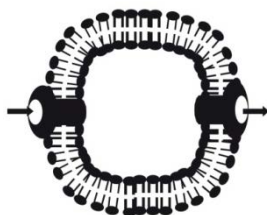


Figura 1. Esquema de un dispositivo ideal basado en una cubierta y poros para el intercambio dentro-fuera[9].

Encapsulación

En el caso de nanofábricas encapsuladas, el confinamiento molecular en un área relativamente pequeña, como es el lumen interior de una vesícula, aumenta la probabilidad de colisión y por tanto incrementa la velocidad de reacción. En el caso de actuar como un mero contenedor, las capsulas lipídicas aportan la capacidad de conducir específicamente fármacos y genes hacia un determinado foco, minimizando el gasto de recursos así como su interacción con moléculas no deseadas.

Recubrimiento para focalización

La localización *in vivo* de estos dispositivos en un sitio específico de la célula podría ser esencial para el éxito del mismo. El empleo de receptores de ligandos específicos es una de las estrategias más utilizadas para la focalización. La utilización de estas señales específicas de la zona objetivo permite la retención de los dispositivos en dianas específicas, evitando interacciones inespecíficas con zonas no deseadas. Un ejemplo de ello puede observarse en terapias anticancerígenas, donde el factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF) está sobre-expresado para favorecer la nutrición de los tejidos cancerígenos. Una estrategia adecuada sería la señalización en la cubierta vesicular con receptores de VEGF. Otro ejemplo similar consistiría en el marcaje de la superficie con moléculas específicas para el receptor de las interleucina-2 expresados por los linfocitos T transformados. Un factor en contra de la eventual focalización es el número de barreras biológicas que encontrará el dispositivo en función de la forma de administración (epidérmica, pulmonar, sangre, etc...), siendo este un aspecto que debe ser cuidadosamente considerado a la hora de realizar un diseño adecuado del dispositivo [9].

Introducción

2. Membranas biológicas:

2.1 Introducción

La célula necesita mantener un medio interno apropiado para poder llevar a cabo las reacciones químicas necesarias del mantenimiento de la vida. Ésto es posible gracias a que los sistemas vivos, excepto algunos virus, se encuentran separados del medio externo inanimado por membranas celulares que permiten el intercambio selectivo de material. En el caso de células eucariotas, existen membranas internas que limitan compartimentos adicionales donde se realizan funciones altamente específicas, necesarias para la supervivencia celular. Las membranas celulares no son paredes rígidas, sino estructuras complejas y dinámicas compuestas por moléculas que poseen características especiales. Tales características hacen posible la existencia de interacciones específicas entre los sistemas de membrana internos de la célula, y de ésta con el medio que la rodea.

2.1.1 Historia

Hoy en día, la comunidad científica es consciente de la complejidad estructural y la importancia funcional de la membrana, aunque no siempre ha sido así. El entendimiento de las biomembranas no emergió de la Biología Molecular sino de la Química Física, en concreto, del estudio de las moléculas lipídicas en su interacción con el agua. Plinio el Viejo (23-79 d. C.) en su trabajo enciclopédico, *Historia Natural*, observó que “... *el agua del mar es tranquilizada por el aceite...*” En los siglos posteriores esta idea continuó presente y fue Benjamin Franklin en 1774 quien realizó el primer estudio científico del efecto del aceite sobre la superficie del agua en un experimento sencillo realizado durante uno de sus viajes diplomáticos a Inglaterra [14]. Franklin añadió una pequeña cantidad de aceite, la de una cucharilla de té, sobre la superficie del agua de un pequeño estanque e inmediatamente observó cómo el aceite se esparcía formando una película fina sobre dicha superficie hasta que una gran parte del estanque se volvía “*lisa como un cristal*” [15]. Algo más de un siglo después, en 1890, Lord Rayleigh realizó una serie de experimentos cuantitativos con aceite y agua. A raíz de este experimento, fue capaz de medir el área sobre la que se esparcía un volumen

conocido de aceite y calculó el espesor de la película así formada. Sus resultados fueron publicados pero, fueron tenidos en cuenta sólo por algunos expertos en el campo. Al año siguiente recibió una carta de una investigadora alemana llamada Agnes Pockels, describiéndole algunos de los experimentos que había realizado en su cocina con un dispositivo desarrollado por ella misma que permitía medir con exactitud el área ocupada por una película de aceite. Agnes Pockels, con ayuda de Lord Rayleigh, publicó sus resultados en el primero de los catorce artículos científicos que le seguirían. Su gran contribución fue, sin duda, su dispositivo experimental, aún hoy utilizado en el estudio de fenómenos superficiales.

En el ámbito de la Botánica C. Nageli (1855) y W. Pfeffer (1875) sugirieron la existencia de membranas limitantes en células vegetales. Pero fue C. E. Overton, al mismo tiempo que Lord Rayleigh experimentaba con las películas de aceite, quien descubrió accidentalmente algunas propiedades importantes de las membranas mientras realizaba sus estudios de doctorado en Botánica. En concreto descubrió que la capacidad de una sustancia para pasar a través de una membrana estaba relacionada con su naturaleza química y que eran las sustancias apolares las que lo hacían más rápidamente, al “*disolverse*” en su interior.

Ya en las primeras décadas del s. XX fue Irving Langmuir quien realizó la mayor parte de la investigación sobre películas de aceite [16]. Langmuir trabajaba en los laboratorios de la compañía *General Electric* investigando monocapas de adsorción de gases en sólidos y modelos moleculares a través de la interacción de películas de aceite con agua. Usando una versión mejorada del dispositivo experimental desarrollado por A. Pockels (actualmente denominado Balanza de Langmuir) fue capaz de medir el área superficial ocupada por cantidades conocidas de aceite. Propuso que las moléculas de ácido graso formaban monocapas en las que los grupos carboxílicos estaban en contacto con la superficie del agua y las cadenas hidrocarbonadas se orientaban verticalmente alejándose de ella. Ésto fue una pieza clave en el entendimiento de las bicapas lipídicas y de las membranas.

En 1925, E. Gorter y F. Grendel extrajeron los lípidos presentes en la membrana del eritrocito usando disolventes orgánicos y demostraron que la cantidad de lípido era dos veces la necesaria para rodear a la célula. De esta manera llegaron a la conclusión de que la membrana se compone de fosfolípidos, y que su grosor no es superior al de dos moléculas de éstos (5-10 nm). Con ello, propusieron que los lípidos en la membrana del eritrocito se encontraban dispuestos en forma de bicapa [17]. Posteriormente otros científicos demostraron que en la publicación de Gorter y Grendel había dos errores que se compensaban: subestimaron el área de las células (no

consideraron el área ocupada por las proteínas puesto que no existía el concepto de proteína integral de membrana) y no extrajeron la totalidad de los lípidos [18, 19].

El primer modelo de membrana aceptado por la mayoría de los científicos fue propuesto por J. F. Danielli y H. Davson en 1935 y se denominó *modelo tipo sándwich*, tal como se representa en la Fig. 2. El modelo era básicamente una bicapa de lípidos (como la descrita por Gorter y Grendel) cubierta por ambos lados por proteínas [20]. Versiones posteriores del modelo incluirían proteínas insertadas en la membrana.

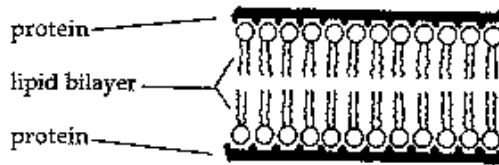


Figure 4 Danielli-Davson model

Figura 2. Modelo tipo sándwich de Danielli y Davson. Bicapa lipídica cubierta por proteínas por ambos lados.

En 1957, J. D. Robertson modificó el modelo basándose en estudios de microscopía electrónica [21] y propuso el denominado *modelo de Membrana Unidad*. Bajo la magnificación proporcionada por el microscopio electrónico de transmisión, las membranas tienen una apariencia “trilaminar” consistente en dos líneas exteriores oscuras y una región interna más clara, tal como se muestra en la Fig. 3. De acuerdo con este modelo las dos líneas oscuras corresponden a las capas proteicas y la región clara a la bicapa lipídica. Debido a que la mayor parte de las proteínas tienen un diámetro mayor a 10 nm, uno de los principales problemas para comprender la estructura básica de las membranas consistía en determinar la forma en que dichas moléculas se disponían en un espacio tan pequeño.

Éste fue el modelo básico de estructura de membrana aceptado por los biólogos durante las décadas de los 60 y 70. Sin embargo, no era adecuado para explicar algunos descubrimientos posteriores [22] y fue reemplazado por el denominado *modelo de Mosaico Fluido* propuesto por S. J. Singer y G. L. Nicolson en 1972 [23]. Su base estructural es una bicapa lipídica en la cual están inmersas diversas proteínas.

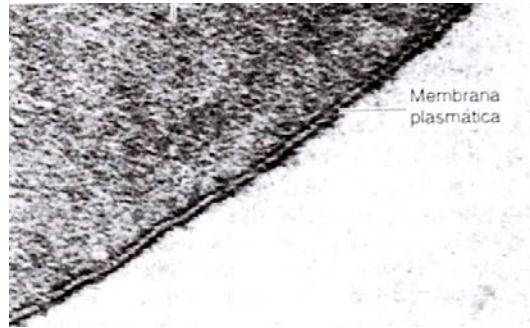


Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión de una membrana.

La bicapa lipídica está esencialmente constituida por una doble capa de fosfolípidos organizados con las cabezas polares hacia el exterior interaccionando con las moléculas de agua del medio celular y las colas hidrocarbonadas hacia el interior. Dicha bicapa actúa de barrera relativamente impermeable al paso de moléculas hidrosolubles. Las proteínas, que normalmente se hallan “disueltas” en la bicapa lipídica, actúan como mediadores o facilitadores de casi todas las funciones de membrana, ya sea transportando moléculas específicas a través de ella o catalizando reacciones asociadas a la membrana, como la síntesis de ATP. Algunas proteínas actúan como eslabones estructurales que relacionan la membrana plasmática con el citoesqueleto o con la matriz extracelular de las células adyacentes, mientras que otras proteínas actúan como receptores y se encargan de la transducción de las señales químicas procedentes del entorno celular. La totalidad de la membrana es fluida, las moléculas lipídicas se desplazan fácilmente dentro de cada cara de la bicapa mientras que las proteínas se mueven libremente dentro de toda la bicapa (ver Fig. 4). La naturaleza de dichas proteínas de membrana fue estudiada con más detalle por N. Unwin y R. Henderson en 1984, quienes encontraron que una gran proporción de ellas eran de naturaleza hidrofóbica y que su estructura tridimensional era tipo α -hélice [24].

En la actualidad, existen evidencias que sugieren que la imagen simplista y uniforme del *modelo de Mosaico Fluido* no representa más que una burda descripción de la membrana celular, habiendo amplio consenso acerca de la existencia en la membrana de heterogeneidades a escala mesoscópica, en forma de dominios con distinto grado de orden y composición lipídica, denominados *rafts* [25].

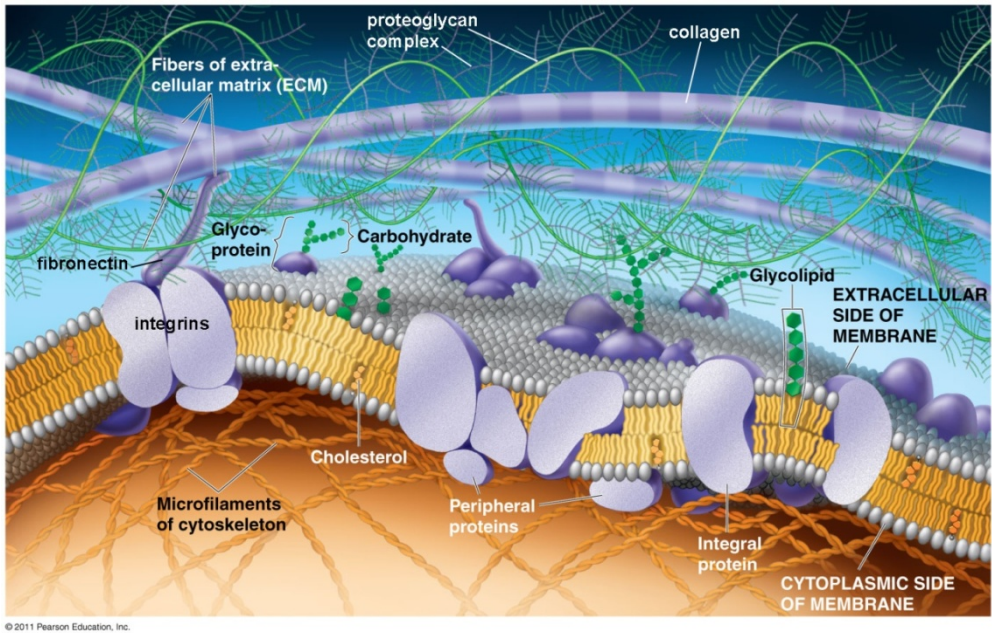


Figura 4. *Modelo Mosaico Fluido* de Singer y Nicolson. Su teoría postula que las proteínas integrales parecen “icebergs” que flotan en la bicapa lipídica. (Pearson Education, Inc 2011 ©)

2.1.2 Composición de la Bicapa Lipídica: Fosfolípidos y otros

Hoy en día se sabe que los lípidos de membrana tienen propiedades especiales que les permiten formar estructuras de doble capa, y que estas estructuras permiten la integración de membranas biológicas.

Las moléculas anfipáticas, y en particular los lípidos, juegan un papel vital, desde la formación de estructuras de membrana hasta la estabilización de proteínas globulares o la formación de orgánulos complejos. En términos de estructura química, las moléculas anfipáticas tienen grupos hidrofóbicos alquílicos o aromáticos combinados con grupos polares y/o iónicos con carácter hidrofílico. La necesidad de minimizar la energía del sistema es lo que conduce a la formación de estructuras agregadas como micelas o al fenómeno de la adsorción en interfases con formación de monocapas, bicapas, estructuras vesiculares y, por supuesto, a la existencia de membranas biológicas [26].

La estabilidad de las membranas biológicas y los sistemas funcionales asociados con ellas dependen de la naturaleza anfipática de sus componentes, específicamente de los lípidos de membrana, proteínas y glucoproteínas. En lo que respecta a las propiedades de equilibrio y mecánicas de las membranas, son los lípidos los que juegan un papel más importante, mientras que las proteínas son las que exhiben funcionalidades biológicas específicas.

Los lípidos de las membranas celulares se clasifican en cuatro grandes grupos que, tal como se esquematiza en la Fig. 5, son: fosfolípidos, esteroides, esfingolípidos y glucolípidos [27, 28].

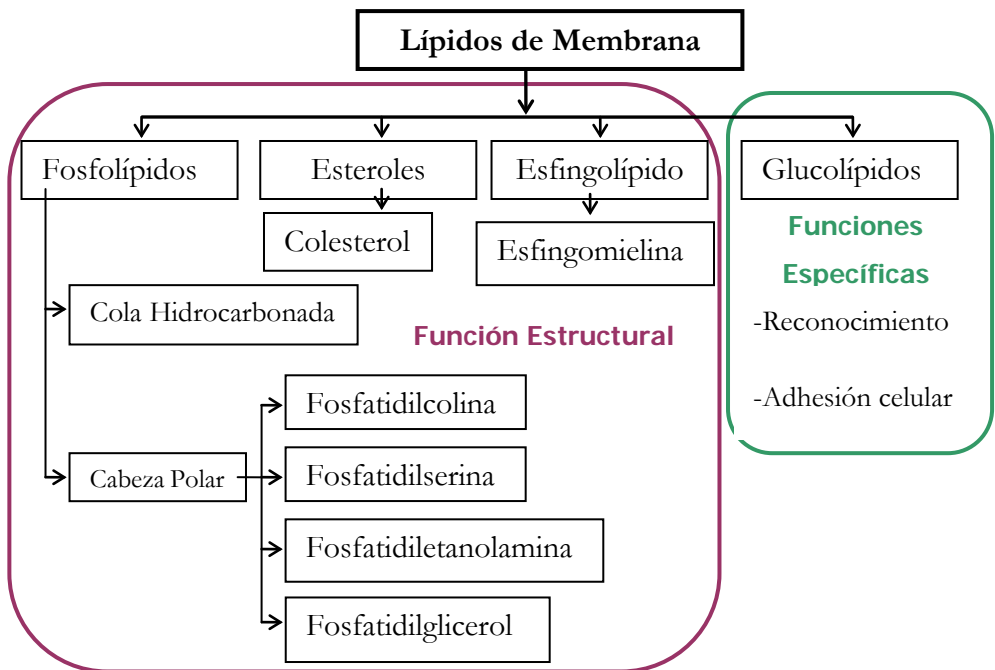


Figura 5. Clasificación estructural y funcional de los lípidos presentes en las membranas de células eucariotas.

Los lípidos mayoritarios en las membranas de células eucariotas son las fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilglicelores y esfingomielinas que, junto con el colesterol, desempeñan función estructural. Aunque la proporción relativa de estos lípidos varía en función de la especie y tipo de célula, en los vertebrados, el colesterol está presente en un 30-40 % (molar), los

esfingolípidos en un 10-20 % y los fosfolípidos en un 40-60 % respecto del total de los lípidos presentes en la membrana plasmática [29].

La razón de la gran variedad de lípidos presentes en las biomembranas es aún hoy una cuestión abierta. Quizás, en parte, se deba a que las distintas especies moleculares son necesarias para los distintos tipos de proteínas que se hallan asociadas a la membrana, y que sólo pueden funcionar en presencia de grupos polares específicos, como los que brinda la cabeza polar de los distintos tipos de fosfolípidos y esfingolípidos. Pero, ¿por qué las fracciones molares de estas especies varían en las distintas membranas? ¿Cuál es la dependencia de la estructura lateral y dinámica de la membrana con la composición lipídica y con las interacciones entre lípidos y proteínas? Estas preguntas permanecen aún hoy abiertas, haciendo que la investigación en membranas sea una de las áreas de mayor actividad, abarcando desde la biología celular hasta la biofísica.

Los glucolípidos, a diferencia, se encuentran en cantidades abrumadoramente minoritarias y únicamente están presentes en la mitad no citoplasmática de la membrana, donde los grupos azúcares quedan al descubierto en la superficie de la célula, lo que sugiere que deben desempeñar una función en las interacciones de la célula con su entorno. Respecto a los fosfolípidos, todos ellos son estructuralmente similares (ver Fig. 6). Su unidad fundamental es glicerol, al cual se unen dos cadenas hidrocarbonadas saturadas o insaturadas y de longitud variable. El grupo -OH del glicerol en posición 3 se une a un grupo fosfato con carga negativa que actúa de puente a un grupo polar amino que da nombre a la familia genérica del fosfolípido. Los grupos de cabeza más frecuentes son: colina, serina y etanolamina. Respecto a la longitud de las cadenas, dependiendo del tipo de organismo, se pueden encontrar tamaños comprendidos entre 10 y 28 átomos de carbono. Sin embargo, en organismos superiores, los fosfolípidos más frecuentes incluyen cadenas en el intervalo C14-C24. En cuanto a los fosfolípidos insaturados, normalmente presentan un único doble enlace en una de las cadenas. Su conformación suele ser *cis*, lo que genera una curvatura en la cadena y dificulta el empaquetamiento, produciendo un significativo aumento en la fluidez del sistema.

Los esfingolípidos están basados en un alcohol más complejo, la esfingosina y contienen un único enlace amida con una cadena de ácido graso, que normalmente es saturada y de 24 átomos de carbono. Además, presentan un alcohol fosforilado (normalmente fosfatidilcolina), o una o más moléculas de azúcar unidas al grupo hidroxilo terminal de la esfingosina.

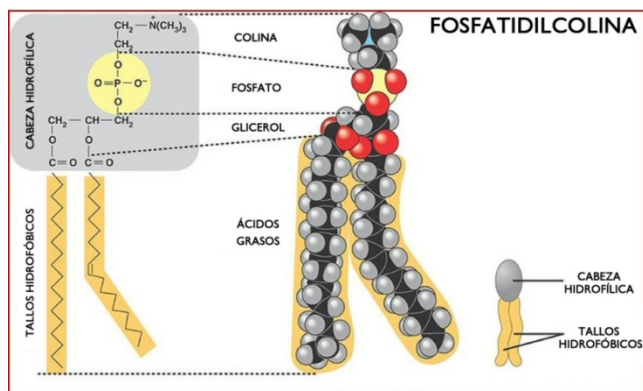


Figura 6. Molécula de fosfatidilcolina. (Adaptado de biologicalphysics.iop.org)

La segunda cadena hidrocarbonada de los esfingolípidos es realmente la parte apolar de la propia molécula de esfingosina, y a diferencia de los fosfolípidos, tienen un grupo hidroxilo sin esterificar en posición C3, que puede actuar como dador-aceptor de enlace de hidrógeno.

Respecto a la distribución de dichos lípidos en la membrana, es un hecho bien conocido la asimetría de carga entre ambas caras responsable de la existencia de un potencial de membrana relevante en procesos de transporte. Dicha asimetría de carga es debida a la acumulación preferente de moléculas con fosfatidilserina, cargadas negativamente en la cara interna. La acumulación de moléculas de fosfatidilcolina y esfingomieline en la cara externa de la membrana es la responsable de su curvatura convexa. Puesto que se trata de un grupo de cabeza muy voluminoso se favorece la expansión de la estructura a nivel del plano exterior, quedando más comprimida a nivel de las colas que tienen gran capacidad de empaquetamiento. Este efecto se encuentra reforzado por el hecho de que las fosfatidilcolinas de la cara externa portan en su mayoría cadenas saturadas que favorecen dicho empaquetamiento. En cambio, la cara interna contiene fosfolípidos con grupos de cabeza amino primarios, mucho menos voluminosos, incluso que las cadenas hidrocarbonadas, las cuales son además predominantemente insaturadas, favoreciendo de este modo la fluidez de la cara interna. En resumen, la asimetría en la distribución de los grupos de cabeza va acompañada de una asimetría en el carácter saturado de las colas hidrocarbonadas, y todo ello tiene profundas implicaciones tanto en la estructura como en la fluidez de la membrana [30].

La distribución transversal del colesterol está peor comprendida. Se asume que se distribuye por igual en las dos caras de la bicapa. Sin embargo, es posible que la

monocapa externa esté algo más enriquecida en dicho componente puesto que éste presenta gran afinidad por las esfingomielinas y fosfatidilcolinas presentes en dicha cara.

2.1.3 Modelo de Bicapa Curvada: Vesículas

Las vesículas lipídicas están constituidas por bicapas lipídicas que estabilizan sus bordes hidrofóbicos expuestos al agua formando una membrana cerrada la cual encierra una cavidad acuosa en su interior. Dichas cavidades pueden estar compuestas por una única o por múltiples lamelas, que son normalmente bicapas, y separan el fluido interno del medio externo en el que se hayan suspendidas. En el caso de que sea una única bicapa la que separe el interior del disolvente externo (ver Fig. 7), las estructuras se denominan, en función de su tamaño, vesículas unilamelares pequeñas, grandes o gigantes (SUV, LUV o GUV respectivamente) mientras que el término vesículas multilamelares (MLV) se usa en el caso de que sean varias bicapas las que de forma concéntrica atrapen disolvente en los espacios intralamelares. Dichas estructuras son importantes en diferentes áreas de ciencia y tecnología. No sólo se emplean como modelo de biomembrana sino también sirven como vehículos para la liberación de fármacos, material genético y enzimas dentro de células vivas.

A pesar de su uso extensivo y sus diversas aplicaciones el mecanismo de su formación no está completamente entendido. En los últimos años, se están desarrollado teorías que tratan de explicar qué factores gobiernan tanto su formación como su fusión para generar bicapas planas físicamente adsorbidas a un sustrato [31]. La inestabilidad termodinámica inherente a estas estructuras hace muy difícil su análisis. Además las características físicas de las vesículas producidas (distribución de tamaños, estabilidad y número de lamelas) dependen del método empleado en su preparación [32].

Las vesículas multilamelares, MLVs, se forman quasi-espontáneamente cuando películas lipídicas secas se hidratan con un exceso de agua o disolución tampón (ver Fig. 9) [33, 34].

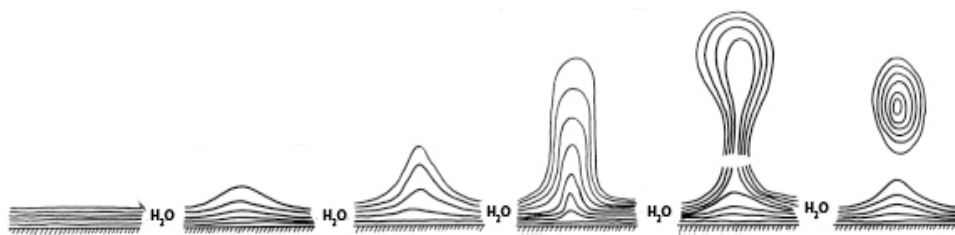


Figura 7. Representación esquemática de la formación de MLV por hidratación de la película fosfolípida seca. Las líneas representan las bicapas de fosfolípidos[35].

Sin embargo, las vesículas unilamelares, tanto las SUVs como las LUVs, presentan energías libres mayores, requiriendo por tanto un aporte de energía al sistema para producirlas (ver Fig. 8). Normalmente, las SUVs son estables durante varias semanas pero después se agregan y fusionan dando lugar a las LUVs y MLVs. Las LUVs tras varios días se transforman en MLVs y después dicha dispersión de MLVs da lugar a un sistema bifásico en el que coexisten una fase enriquecida en fosfolípido y pobre en agua con otra pobre en fosfolípido y enriquecida en agua.

Las vesículas unilamelares pequeñas, SUVs, presentan tamaños comprendidos entre 20 y 100 nm y pueden prepararse mediante diversas técnicas basadas en aportar energía a suspensiones de vesículas multilamelares. Dicha aportación energética puede hacerse mediante sonicación o mediante extrusión [36-38]. Las vesículas unilamelares grandes, LUVs, presentan tamaños desde 0.1 hasta 1 μm , y pueden prepararse mediante el método de eliminación de disolvente [39], método de inyección [40] o método de evaporación de fase inversa [41]. Y por último, las vesículas unilamelares gigantes, GUVs, presentan diámetros de hasta 100 μm , y pueden prepararse mediante el método de hidratación suave [42, 43], método de evaporación de disolvente [44] o método de electroformación [45]. Las condiciones de protocolo comunes a todos estos métodos son la utilización de una baja fuerza iónica y la falta de agitación mecánica. Aunque hoy en día existe un método, (el utilizado en este trabajo, que utiliza fuerza iónica) [46].

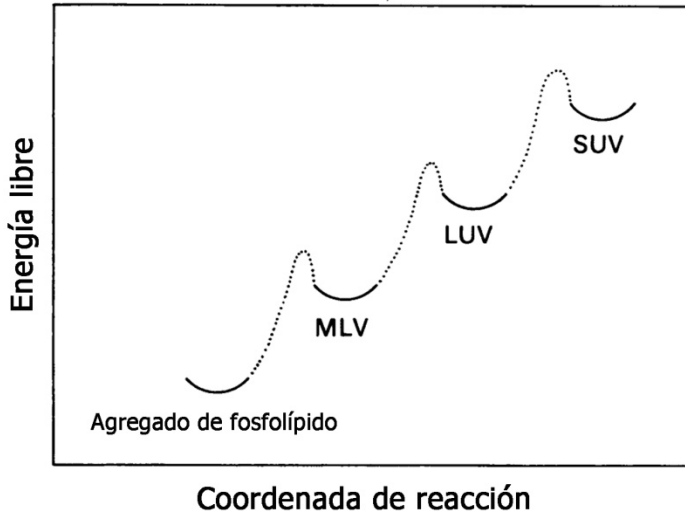


Figura 8. Diagrama energético de los diferentes agregados lipídicos. El valor de energía mínima de cada estructura está colocado sólo aproximadamente. Si el módulo de curvatura elástica es bajo, la diferencia de energía entre LUV y SUV disminuye debido a la contribución entrópica [35].

2.2 Propiedades mecánicas de membranas:

Una membrana lipídica tiene un espesor aproximado de 5 nm, por lo que macroscópicamente, la membrana puede modelizarse como un objeto bidimensional embebido en un espacio tridimensional, lo cual le confiere unas características mecánicas particulares. Las bicapas lipídicas son elásticas y pueden ser deformadas de tres formas: extensión-compresión, deformación por cizalla a superficie constante y deformación perpendicular a un plano de la membrana por curvatura (Ver Fig. 9). Cada una de estas tres deformaciones tiene asociada una energía elástica [47].

La energía de extensión-compresión por unidad superficial de membrana F_{ext} depende del cambio relativo del área $\Delta A/A$ de manera cuadrática:

$$F_{\text{ext}} = \frac{1}{2} \varepsilon \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (1)$$

Donde ε es el módulo de compresibilidad, mientras que la energía asociada a la deformación por cizalla se define como:

$$F_{ciz} = \frac{1}{2}\mu(\tilde{\lambda}^2 + \tilde{\lambda}^{-2} - 2) \quad (2)$$

En esta expresión $\tilde{\lambda} = (L_0 + \Delta L)/L_0$ es la variación de la extensión lateral y μ es el módulo de cizalla, cuya energía es despreciable para una membrana fluida. En el caso de membranas cristalinas o polimerizadas, la contribución de los modos de cizalla debe de ser considerada [48].

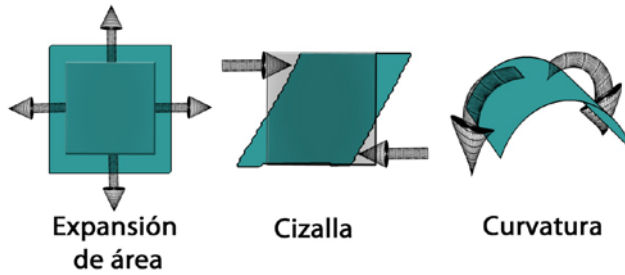


Figura 9. Modos de deformación a los que se somete una bicapa lipídica.

La curvatura de la membrana contribuye a la energía de la siguiente forma:

$$F_{curv} = \frac{1}{2}\kappa(C - C_0)^2 + \kappa_G C_1 C_2 \quad (3)$$

En la que $C = C_1 + C_2$ es la curvatura media de la membrana mientras que $C_1 = 1/R_1$ y $C_2 = 1/R_2$ son las principales curvaturas [49]. Por otro lado, C_0 (curvatura espontanea) es un término que caracteriza la relajación de la membrana hacia un estado con una curvatura preferente y $C_1 C_2$ es la curvatura Gaussiana, κ es el módulo de curvatura o rigidez y κ_G el módulo de curvatura Gaussiana. La curvatura Gaussiana introduce un término, que integrado sobre una superficie cerrada es una invariante del sistema que tan solo depende de la topología de la superficie (teorema de Gauss-Bonnet).

De todo esto, puede definirse la energía elástica (por unidad de superficie) como:

$$F = \frac{1}{2}\varepsilon \left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \frac{1}{2}\mu(\tilde{\lambda}^2 + \tilde{\lambda}^{-2} - 2) + \frac{1}{2}\kappa(C - C_0)^2 + \kappa_G C_1 C_2 \quad (4)$$

Donde los coeficientes ε, μ y κ son los correspondientes módulos elásticos bidimensionales.

Otro parámetro microscópico de elevada importancia para describir la membrana lipídica es la tensión lateral σ . Cuando se aplica una fuerza externa sobre la membrana, la superficie total de la membrana varía pasando a un estado tensionado, la existencia de este estado tensionado es debida a la variación de la superficie de la membrana y la tensión superficial. Cuando varía la superficie ΔA , la energía libre aumenta en $\sigma \Delta A$. Teniendo en cuenta la definición clásica de tensión superficial $\sigma = \partial F / \partial A$, donde F es la energía libre de la membrana, de forma que a las definiciones anteriores de energía podemos añadirles un término nuevo de energía debido a la tensión:

$$F_{tens} = \sigma \frac{\Delta A}{A} \quad (5)$$

2.2.1 Fluctuaciones térmicas:

Cuando una membrana es observada bajo el microscopio óptico es posible apreciar un movimiento fluctuante en la superficie de la membrana. El origen de este movimiento está relacionado con la agitación térmica (las moléculas de disolvente chocan contra la membrana y generan una deformación que puede ser observada a modo de fluctuaciones en la membrana). La energía transferida a la membrana por el movimiento browniano de las moléculas puede medirse en el orden de $\kappa_B T$ (donde κ_B es la constante de Boltzman y T la temperatura absoluta), por lo que a partir de esta información puede obtenerse información acerca de los parámetros mecánicos que gobiernan el sistema.

Los primeros modelos propuestos para el análisis del movimiento térmico de membranas consideraban que las fluctuaciones de membrana ocurrían en una escala espacial más pequeña que las dimensiones del sistema, por lo que se consideró la bicapa como un plano de naturaleza continua, donde la energía total de una membrana fluida que fluctúa está dominada principalmente por dos términos, la energía de curvatura (F_{curv}) y la tensión (F_{tens}). Con la ayuda de la geometría diferencial [50] se puede demostrar que la curvatura local de la membrana es [51]:

$$C = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} = (\nabla^2 \zeta)^2 \quad (6)$$

Donde ζ es la amplitud de las fluctuaciones de un punto de la membrana en el tiempo t . La contribución de la tensión lateral a la energía elástica de la membrana, también puede ser expresada en función de la amplitud de las fluctuaciones como [52]:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{(\nabla \zeta)^2}{2} \quad (7)$$

En este modelo llamado, modelo de curvatura, donde la energía total de la membrana está descrita como:

$$F = \iint_A \left[\frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 \zeta)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla \zeta)^2 \right] dS \quad (8)$$

Donde F es el Hamiltoniano de Canham-Helfrich, (dentro del cual intervienen el módulo de curvatura κ , la tensión lateral σ y una aproximación armónica que consiste en el desarrollo en potencia de orden dos de ζ).

2.2.2 Espectro de fluctuaciones:

El espectro de fluctuaciones es la representación gráfica de cuánto se desplaza perpendicularmente la bicapa respecto de su posición media. En él, se cuantifica la intensidad de las fluctuaciones térmicas respecto de un plano de referencia. Esta intensidad, es obtenida a partir de la amplitud del desplazamiento de la membrana ζ .

Su cálculo es realizado en el espacio recíproco introduciendo la transformada de Fourier de $\zeta(x, y, t) = \zeta(r, t)$ considerando a r como el vector de posición bidimensional con coordenadas (x, y) , donde las coordenadas q_x, q_y están definidas por

$$\zeta(r, t) = \iint \zeta(q, t) \exp(iqr) d^2q \quad (9)$$

Al ser puramente térmica la fuente de las fluctuaciones en equilibrio, puede aplicarse el teorema de equipartición de la energía, de tal modo que para cada grado de libertad, la energía libre promedio es $\langle F \rangle = k_B T / 2$ (aquí el símbolo $\langle \rangle$ describe el promedio estadístico). Por tanto, cada modo de movimiento, caracterizado por un valor del vector de onda (definido como q) está definido por el promedio en el tiempo de los desplazamientos cuadráticos de la membrana respecto de su posición de equilibrio $\langle \zeta_q \zeta_q \rangle$, y es [49]:

$$\langle \zeta_q \zeta_q \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} \quad (10)$$

A través de esta ecuación, es posible cuantificar la energía necesaria para curvar una membrana inicialmente plana mediante un modo de curvatura caracterizado por la longitud de onda $\lambda = 2\pi/q$, de modo tal que la energía térmica está repartida por igual sobre todos los modos de fluctuación. Sin embargo, los modos más pequeños son más fáciles de excitar y la amplitud de fluctuación observada en ellos es mayor, por lo que la amplitud disminuye a medida que se incrementa q . En una membrana esférica, el cual es el caso de una vesícula lipídica, solo determinados modos son posibles $qR=n=1,2\dots q_{\max}$, los cuales son aquellos compatibles con los armónicos esféricos que se distribuyen discretizadamente sobre la superficie de la esfera. En este tipo de representaciones pueden observarse dos regímenes de fluctuaciones en función de q , uno dominado por curvatura ($q > q_c$) donde $q_c = \sqrt{\sigma/\kappa}$, y un segundo régimen dominado por la tensión, ($q < q_c$).

De ese modo, en un régimen dominado por curvatura ($\sigma = 0$), se puede dar información acerca del orden de magnitud de la amplitud de las fluctuaciones si se integra la ecuación (10) anterior entre los $q_{\min} = 2\pi/L$ y $q_{\max} = 2\pi/a$, obteniéndose:

$$\langle \zeta(L) \rangle \propto \sqrt{\frac{k_B}{\kappa}} L \quad (11)$$

En una membrana típica, de $L = 10 \mu\text{m}$ y $\kappa = 10 k_B T$, la amplitud valdría $\langle \zeta(L) \rangle = 3 \mu\text{m}$.

Mientras que en un régimen dominado por tensión, la amplitud disminuye considerablemente.

$$\langle \zeta(L) \rangle \propto \sqrt{\frac{k_B}{\sigma}} \ln \frac{L}{a} \quad (12)$$

Con valores típicos de $\sigma = 1 \times 10^6 \text{ Nm}^{-1}$ y $a = 0.5 \text{ nm}$, la amplitud se reduciría 50 veces ($\langle \zeta(L) \rangle = 0.06 \mu\text{m}$).

2.2.3 Dinámica de membranas:

Las fluctuaciones de membrana están debidas principalmente a la energía térmica del sistema, pero esa fuerza, a su vez, está contrarrestada en el tiempo por otra fuerza disipativa, de tal forma que el movimiento de la membrana está contrarrestado por la fricción sufrida por el medio que la rodea (viscosidad del medio η). Por lo que la disminución en el tiempo de la amplitud de las fluctuaciones depende directamente de la viscosidad del medio. Teniendo en cuenta la ecuación del movimiento para un fluido incompresible en ausencia de fuerzas inerciales (en régimen browniano, la velocidad de la membrana es constante y viene dada por la velocidad límite) [53-56], podemos obtener la expresión para la función de autocorrelación temporal de las fluctuaciones.

$$\langle \zeta(q, t), \zeta(q', t') \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} \exp(-\Gamma t) \quad (13)$$

Donde la frecuencia de relajación (Γ) da cuenta de la influencia de la disipación viscosa ejercida por el disolvente acuoso sobre las fluctuaciones de la membrana.

$$\Gamma = \frac{\kappa q^3 + \sigma q}{4\eta} \quad (14)$$

En esta expresión, los términos en el numerador proceden de la frecuencia del oscilador mecánico análogo de las fluctuaciones transversales de la membrana y el denominador da cuenta de la energía disipada por fricción viscosa entre la membrana en movimiento en el seno de un fluido de viscosidad η . La función de autocorrelación temporal de las fluctuaciones informa de la dependencia de la frecuencia de relajación de las fluctuaciones en función del vector de onda para los distintos regímenes, de forma que cuando $\Gamma \sim q$ nos encontramos en un régimen dominado por tensión y cuando $\Gamma \sim q^3$ estamos en un régimen dominado por elasticidad de curvatura.

2.2.4 Acoplamiento entre monocapas

Consideremos la membrana con la estructura interna en bicapa propia de las biomembranas lipídicas. En tal caso, la membrana está constituida por una bicapa lipídica, constituida por dos monocapas de espesor finito enfrentadas *cola-a-cola* a través de débiles interacciones de van der Waals y entre las cuales pueden aparecer movimientos de deslizamiento relativo dependiendo de la densidad local de cada una de ellas. Cuando la bicapa se curva bajo el efecto de un movimiento de flexión, una de

las monocapa se contrae mientras que la otra se expande proporcionalmente. Esto provoca una diferencia de densidad a nivel local que la membrana intenta compensar mediante cambios de forma, translocación de moléculas entre las monocapas o deslizamiento de una monocapa sobre la otra (fricción). Estos mecanismos de compensación a curvatura, conllevan la necesidad de tener en cuenta una fuente de disipación adicional en la amplitud de las fluctuaciones [57-59].

En 1993, Seifert y Langer [59]propusieron un término adicional al funcional de energía de Helfrich, en el que relacionaban esta diferencia de área (compresión-expansión) con cambios locales de densidad ρ :

$$F = \frac{1}{2} \iint_A dS \{ \kappa (\nabla^2 \zeta)^2 + \sigma (\nabla \zeta)^2 + \varepsilon^m [(\bar{\rho}^2 + (\rho \pm d \nabla^2 \zeta)^2)] \} \quad (15)$$

Mediante esta expresión, si las diferencias laterales de densidad son acomodadas en la forma de la membrana, se recupera la expresión para la energía clásica, pero si esta acomodación no fuese posible, aparece una nueva contribución energética dominada por el módulo de compresión de una monocapa ε^m y una longitud $d = h/4$, donde h es el espesor total de la membrana.

Desde el punto de vista energético, la contribución de este término tiene dos consecuencias importantes:

- La energía térmica debe ser repartida entre dos modos de fluctuación: Un modo relacionado con curvatura-tensión y un modo que tenga en cuenta el acoplamiento entre la curvatura y las dilataciones de las monocapas que constituyen la membrana.
- Las diferencias de densidad o área que se producen durante la curvatura de la membrana, si no son acomodadas, provocan que las monocapas relajen hacia su estado inicial a partir de un mecanismo que incluye el desplazamiento de una sobre la otra. Este mecanismo de fricción está directamente relacionado con el coeficiente de fricción entre monocapas (b) y con el módulo de compresión entre las dos monocapas (ε^m), actuando como una energía adicional de disipación en la amplitud de las fluctuaciones.

2.2.5 Funciones de autocorrelación

A través del espectro de fluctuaciones (estático), la redistribución lateral de los lípidos puede observarse como un aumento en la amplitud de las fluctuaciones en un rango de q alto [57], pero para analizar de forma más profunda la implicación de estas energías, es necesario realizar un análisis dinámico. Para realizar estos estudios, Seifert y Langer [59], utilizaron la aproximación de Stokes para resolver la ecuación del movimiento de una membrana, en esa aproximación, hicieron un balance entre las fuerzas motrices y las de fricción para obtener las velocidades características de relajación Γ_1 y Γ_2 asociadas a cada fuente de energía.

En las relaciones de dispersión referentes a este análisis se observan tres regímenes diferentes delimitados por el cruce de dos vectores de onda, los cuales varían en función de parámetros experimentales, tales como la viscosidad del medio η , la viscosidad superficial de la membrana η_s , la tensión σ y los parámetros intrínsecos de la membrana (módulo de fricción, módulo de compresibilidad y módulo de curvatura) [55].

$$q_1 = 2\eta\varepsilon/b\kappa$$

$$q_2 = \sqrt{2b/\eta_s}$$

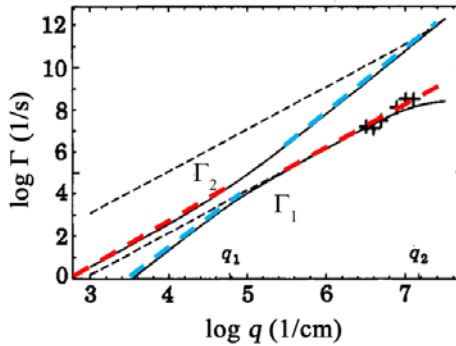


Figura 10. Dispersión de los modos para una bicapa (líneas continuas) y varias bicapas (línea rayada) para un sistema modelo en el que se resalta la dominancia del modo de flexión (línea azul) frente al modo de fricción (línea roja) en función del vector de onda. (Imagen adaptada de *Seifert et al.* [59])

En función del rango de q frente al vector de onda de cruce, la dispersión de los modos (o frecuencias de relajación) puede estar dominada por una energía u otra según se observa en la figura 10. De modo, que la contribución de estas energías en función del vector de onda se describe en las siguientes ecuaciones:

$$\Gamma_1 = \begin{cases} \frac{\kappa}{4\eta} q^3, & q \leq q_1 \\ \frac{\varepsilon}{2b} \frac{\kappa}{\bar{\kappa}} q^2, & q_1 \leq q \leq q_2 \\ \frac{\varepsilon}{\eta_s} \frac{\kappa}{\bar{\kappa}} q^0, & q \geq q_2 \end{cases}$$

$$\Gamma_2 = \begin{cases} \frac{\kappa}{2b} q^2, & q \leq q_1 \\ \frac{\bar{\kappa}}{4\eta} q^3, & q \geq q_2 \end{cases}$$

A valores de q bajos (por debajo del vector de onda de corte (q_1)), el modo de curvatura o modo clásico de flexión hidrodinámico (línea azul), domina sobre el modo debido al deslizamiento de una monocapa sobre la otra, o fricción (línea roja), mientras que para vectores de onda más altos (q_2), este comportamiento se invierte. El mecanismo por el cual ocurre esta inversión, es debido a que a altas frecuencias, la redistribución lateral de los lípidos se hace más lenta convirtiéndose la energía de curvatura en un modo más rápido.

2.2.6 Fluctuaciones de forma de vesículas esféricas: Factor de estructura dinámico

La dinámica de las ondulaciones de curvatura en membranas elásticas usualmente es descrita por el hamiltoniano de Helfrich-Canham [60] en combinación con una lineal hidrodinámica en el régimen viscoso [61, 62]. Si se subestima el régimen de inercia, la ecuación hidrodinámica puede ser descrita en el límite de Stokes, surgiendo su función de correlación dinámica del balance entre los movimientos de restauración elásticos (provocados por la curvatura, rigidez y κ) y la disipación por la viscosidad (gobernado por la viscosidad del medio, η) [62]. Cuando la ecuación dinámica lineal se describe por las fluctuaciones de curvatura en el plano bidimensional de una membrana plana ($k = |\mathbf{k}|$ es el módulo del vector de onda en el plano de una fluctuación transversal), las funciones de autocorrelación de las diferencias de altura pueden obtenerse como [61-63]:

$$\langle h_k(t) h_{-k} \rangle = \langle h_k^2 \rangle_B e^{-\omega_B(k)t} \quad (16)$$

Considerando la amplitud como el ratio entre la energía térmica y la energía elástica del modo de curvatura, tal y como se predice en el teorema de equipartición [52, 63]:

$$\langle h_k^2 \rangle_B = \frac{k_B T}{\kappa} \frac{1}{k^4} \quad (17)$$

Puede observarse que las fluctuaciones más débiles corresponden a las membranas más rígidas, por lo que la dependencia en el tiempo de los modos de curvatura debe estar regida por una velocidad de relajación dependiente de k^3 :

$$\omega_B(k) = \frac{\kappa}{4\eta} k^3 \quad (18)$$

donde la flexión se convierte más rápida con el incremento de la rigidez.

El tratamiento anterior, se considera que la membrana está traslacionalmente inmóvil y que las únicas fluctuaciones que se observan son debidas a la curvatura, por lo que se hace necesaria una teoría más completa para el caso de las vesículas, se asume que los movimientos traslacionales son generados por la difusión en el medio como un todo. Los modos de curvatura aparecen como una serie de modos internos que describen la forma de las fluctuaciones. En el caso membranas esféricas (vesículas, gotas de emulsiones...), la función de dispersión intermedia correspondiente puede describirse como una función del vector de dispersión tridimensional como [64, 65]:

$$S(q, t) = e^{-\Gamma_T t} [A_T(q) + A_B(q) S_B(q, t)] \quad (19)$$

Donde Γ_T es la frecuencia del modo de traslación:

$$\Gamma_T = D_T q^2 \quad (20)$$

Donde D_T es el coeficiente de difusión de la traslación obtenido a partir de la fórmula de Stokes-Einstein:

$$D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (21)$$

Las amplitudes relativas $A_T(q)$ y $A_B(q)$ pueden describirse de una forma en la que sean normalizadas $A_T + A_B = 1$ [64]; donde $A_T(q)$ describe la amplitud relativa del modo de traslación (el cual es proporcional al tamaño del objeto en difusión), mientras que $A_B(q)$ describe las contribuciones relativas de los modos internos, o lo que es lo mismo, las fluctuaciones de la forma en el tiempo (obtenido de $S_B(q, t)$).

Junto con la teoría hidrodinámica, Milner y Safran (MS) describieron la teoría dinámica de las fluctuaciones de las membranas esféricas, en la cual, emparejaban dinámicamente los modos normales de la flexión de la membrana esférica flexible con

la fricción viscosa eficaz ejercida por el disolvente [66]. En su formulación, describieron las ecuaciones hidrodinámicas para los modos de superficie como armónicos esféricos, los cuales pueden ser considerados como un ansatz para las fluctuaciones de forma en topologías esféricas. El empleo de esta teoría para la descripción de la dinámica de las fluctuaciones de forma de gotas de emulsiones ($\kappa \approx 0$) es muy habitual y describe estos movimientos con bastante eficacia, pero su empleo en vesículas no es del todo correcto [67-69], cuando se aplica a membranas rígidas ($\kappa \gg 0$), esta teoría sólo llega a la descripción de una forma cualitativa y los valores de la constante de curvatura que se obtienen suelen ser más altos de los estimados por otras técnicas.

$$S_B^{(0)}(q, t) \approx \exp(-\Gamma_{MS}t) \quad (22)$$

Por ello, Zilman y Granek, en un trabajo teórico pionero [70, 71] propusieron otro factor de estructura dinámico para membranas rígidas basándose en las incongruencias que se obtenían siguiendo la teoría MS en estos sistemas.

Los métodos dinámicos de dispersión, (NSE, DLS...), dan acceso a la función de dispersión intermedia $S(t)$ que contiene la información relevante sobre el factor de estructura de la fluctuación. La dispersión de un objeto fluctuando contiene la información dinámica de las correlaciones entre diferentes puntos. Consecuencia de ello, la contribución por la curvatura $S_B(t)$ corresponde a la convolución entre las diferentes dispersiones de una membrana deformable sometida a las fluctuaciones de forma [64]. En la teoría de ZG se asumen diferentes correlaciones en posiciones relativas de diferentes puntos de la membrana, por lo que el cálculo del factor de estructura dinámico implica el promedio de las diferentes dispersiones ocurridas en la membrana, $S_B(q, t) = S_0 \langle \exp[iq\Delta h(t)] \rangle$, con una amplitud normalizada que decrece según $S_0 \sim q^{-2}$ [72, 73].

Como las fluctuaciones térmicas obedecen a una estadística gaussiana, dicha convolución puede ser calculada una distribución gaussiana del promedio de las fluctuaciones $\langle \exp[iq\Delta h(t)] \rangle = \exp\left(-\frac{q^2 \langle \Delta h^2(t) \rangle}{2}\right)$ [74]. En las membranas rígidas, las fluctuaciones de forma siguen una dinámica sub-difusiva más lenta que las trayectorias de difusión libre esperadas en una membrana muy suave [73]. Concretamente, ZG descubrieron que $\langle \Delta h^2(t) \rangle \approx (Dt)^{2/3}$, con un coeficiente de difusión efectivo $D \approx 0.025(k_B T/\kappa)^{1/2}(k_B T/\eta)q$ [73], así que para las fases de las membranas se espera que la función de dispersión intermedia varía según [70, 72]:

$$S_B^{(ZG)}(q, t) \approx \exp[-(\Gamma_{ZG}t)^{2/3}] \quad (23)$$

con una tasa de decaimiento [70, 72]:

$$\Gamma_{ZG} \approx 0.025 \left(\frac{k_B T}{\kappa} \right)^{1/2} \left(\frac{k_B T}{\eta} \right) q^3 \quad (24)$$

La teoría de ZG predice una exponencial extendida para el factor de estructura de la membrana fluctuando. La extensión de este decaimiento (Ec. 23), indica que la suma de los diferentes modos está correlacionada, lo cual difiere de las membranas totalmente flexibles, en las cuales, estas fluctuaciones se encuentran no correlacionadas y son descritas por un decaimiento exponencial simple (Ec. 22). Las tasas de relajación se espera que decaigan según $\Gamma_{ZG} \sim \kappa^{-1/2}$, lo cual se diferencia de la relajación de los modos de forma individual, donde se ven incrementados según aumenta la rigidez de curvatura, $\omega_B \sim \kappa$.

La teoría de ZG ha sido verificada tanto en experimentos de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) [67, 75], como en experimentos realizados a bajos q 's, mediante Espectroscopia de Neutrones Spin-eco (NSE)[67, 76-78]. Para los experimentos en esta última técnica (NSE), las distancias de medida son tan cortas, que llegan a estar en el orden del espesor de la bicapa, $qh \geq 1$, por lo algunos autores sugieren implementar una viscosidad aparente del disolvente tres veces más grande que la verdadera [79-81]); Sin embargo, Watson y Brown[82, 83] y Arriaga et al [68] sugieren que las desviaciones de la teoría en este rango de q 's se deben a mecanismos disipativos dentro de la bicapa lipídica, por lo que no sólo deben tenerse en cuenta los movimientos debidos a la flexión, sino que deben tenerse en cuenta movimientos locales de densidad lipídica entre cada monocapa, o lo que es lo mismo, con el modo híbrido de disipación comentado en el apartado de anterior (Función de correlación dinámica).

Como se ha comentado, los modos híbridos adquieren mayor importancia a mayores q 's, donde la disipación no está dominada por la fricción contra el disolvente en conjunto, sino que cada vez va adquiriendo mayor importancia la viscosidad intrínseca de la membrana [59, 84]. La influencia de este mecanismo de disipación dentro de la bicapa, previamente se ha discutido en el contexto de los experimentos de NSE [68], sin embargo, no existen aún expresiones precisas que describan en el factor de estructura dinámico un término correspondiente a los modos híbridos.

2.2.7 Efectos mecánicos de la permeabilidad en membranas

La permeabilidad en membranas a través de poros u canales constituye un proceso de disipación de energía que genera fuerzas en la membrana [85]. Debido al transporte transversal de moléculas a través de los mismos, inducen fluctuaciones adicionales cuya fuerza local está determinada por la densidad local de poros en cada localización de la membrana. La dinámica de este proceso está impulsada por la permeabilidad absoluta del poro y ocurre a una escala de tiempo dominada por el coeficiente cinético de permeabilidad (λ), pero limitada a su vez por el coeficiente de difusión lateral de la proteína en la bicapa (D). Como consecuencia de ello, las membranas biológicas son bastante flexibles bajo fluctuaciones térmicas y la existencia de poros les proporciona una fuente adicional de ruido no térmico dando lugar a fluctuaciones adicionales [86, 87].

Teniendo en cuenta esta consideración, durante el estudio de la dinámica de fluctuaciones, la presencia de poros puede considerarse como una presión adicional en el desequilibrio local de permeabilidad $\phi(r, t) = [\rho^\uparrow(r, t) - \rho^\downarrow(r, t)]/\rho_0$, lo cual puede definirse como la diferencia local entre la densidad superficial de transferencia de masa hacia el exterior de poros $\rho^\uparrow(r, t)$, y la densidad de transferencia de ellos hacia atrás $\rho^\downarrow(r, t)$ (el superíndice \uparrow indica transporte de dentro a fuera y \downarrow indica el sentido contrario). ρ_0 es la densidad media de la superficie de los poros insertados en la membrana, $\rho_0 = \langle \rho^\uparrow(r, t) + \rho^\downarrow(r, t) \rangle$, por lo que la definición del desequilibrio $\phi(r, t)$ es adimensional. Para este hecho, Manneville et al. [88] propusieron una extensión en el hamiltoniano de Canham-Helfrich (CH) de modo que:

$$dF[h, \phi] = \frac{1}{2} [\sigma(\nabla h)^2 + \kappa(\nabla^2 h)^2 + \chi(F_p)\phi^2 - 2w\Xi(\nabla^2 h)\phi] dA \quad (25)$$

En esta ecuación, los dos primeros términos corresponden a los términos habituales en el hamiltoniano de CH (tensión superficial (σ) y la curvatura (κ)). El tercer término considera la energía adicional producida por la permeabilidad local, la cual se describe como una energía de Hook de la tensión de desequilibrio. Aunque ligeramente diferente de la definición de desequilibrio adimensional ϕ , este término armónico equivale al introducido por Manneville et al. [88] para describir el desequilibrio de permeación (estos autores definen la tensión de desequilibrio como $\Psi(r, t) = \rho_0 \phi(r, t)$). A partir de este modelo, de la fuerza elemental por unidad de área transmitida por un poro a la membrana en un evento de permeación constante, puede obtenerse la susceptibilidad lineal $\chi(F_p)$. Manneville et al consideraron además

un término de acoplamiento local que une el desequilibrio de permeabilidad con la curvatura local (cuarto término). Este término actúa como un oscilador híbrido caracterizado por una constante de acoplamiento Ξ que es responsable de la disminución de la energía mecánica que se produce en la membrana. El acoplamiento de la curvatura-permeabilidad expresado junto este término asume la escala con el espesor de la membrana, w , el parámetro dimensional que define la fuerza del acoplamiento mecánico entre la deflexión transversal y la deformación longitudinal [51]. El signo negativo del término de acoplamiento es debido a que los poros dan lugar a invaginaciones de la membrana ($(\nabla^2 h) < 0$) contribuyendo a estabilizar el flujo neto hacia el interior ($\phi < 0$) y a la inversa, el flujo hacia el exterior es provocado por protusiones en la membrana. En otras palabras, el termino de acoplamiento contribuye a la estabilización debida a la reducción de la energía de permeabilidad debido al cierre del poro cuando aumenta mucho la curvatura (lo cual puede observarse como un decrecimiento efectivo en la capacidad de permeación, por ejemplo, $(\chi_{eff} = \chi - 2w\Xi|(\nabla^2 h)/\phi| < \chi)$), o como un componente activo que causa un ablandamiento efectivo de la membrana debido a la fuerza de tensión creada por los poros abiertos de la membrana después de cada evento (al aumentar la permeabilidad, el módulo de flexión disminuye como $\chi_{eff} = \kappa - 2w\Xi|\phi/(\nabla^2 h)| < \kappa$). Por lo que considerando una hamiltoniano de permeabilidad y elasticidad equivalente a la Ec. 25 en el formalismo de la disipación de fluctuaciones térmicas, se obtuvo la siguiente expresión analítica para el espectro de amplitudes de las fluctuaciones térmicas:

$$\langle h_q^2 \rangle \approx \frac{k_B T}{\sigma q^2 + \kappa_{eff}^{(\Xi)} q^4} + \frac{k_B T w (w\chi - \Xi)}{(\sigma + \kappa_{eff}^{(\phi)} q^2)(\sigma + \kappa_{eff}^{(\phi)} q^2)} \quad (26)$$

donde los dos módulos de flexión están involucrados:

$$\begin{aligned} \kappa_{eff}^{(\Xi)} &= \kappa - w^2 \Xi \\ \kappa_{eff}^{(\phi)} &= \kappa - 2w^2 \Xi - \frac{w^2 \Xi^2}{\chi} \end{aligned} \quad (27)$$

Para completar el marco teórico, el transporte de permeabilidad debe ser considerado dentro de las ecuaciones relevantes en este ámbito (h y ϕ).

Para la deformación h , la ecuación de Langevin corresponde a:

$$\frac{\partial h}{\partial t} = \Lambda_t \left(\frac{\delta F}{\delta h} \right) + \lambda (\Delta \Pi + \rho_0 F_0 \phi + \rho_0 F'_p \nabla^2 h) + \xi_{th} \quad (28)$$

En esta ecuación dinámica, Λ_t , representa el componente transversal del campo de flujo viscoso (es un tensor de Oseen cuya tensión equivale a $f_z = -\delta F / \delta h$). En estos casos, el tensor hidrodinámico es determinado por un equilibrio entre la permeabilidad y la resistencia friccional $\Lambda_t(q) = \lambda + (4\eta q)^{-1}$, siendo λ el coeficiente de permeabilidad y η la viscosidad del disolvente. En la ecuación 26, el flujo hidrodinámico de la izquierda es igualado a la suma del campo del flujo que describe una flujo de penetración a través de la membrana ($\sim \lambda \Delta \Pi$), el cual es creado por las diferencias de presión osmótica ($\Delta \Pi$) más la fuerza local creada por el desequilibrio de permeación ($\sim \rho_0 F_0 \phi$), el término que describe la sensibilidad de permeación causada por la curvatura ($\sim \rho_0 F'_p \nabla^2 h$) y las fluctuaciones térmicas estocásticas ξ_{th} descritas como un ruido browniano en dirección transversal $\langle \xi_{th}(t) \xi_{th}(t') \rangle = 2\xi_{th} k_B T \Lambda_t(q) \delta(t - t')$.

Por otra parte, la ecuación de transporte correspondiente para el desequilibrio ϕ puede ser escrito como:

$$\frac{\partial h}{\partial t} = \Lambda_l \left(\frac{\delta F}{\delta \phi} \right) + \xi_{th} \quad (29)$$

donde Λ_l es el soporte del componente longitudinal del tensor de Oseen, ($\Lambda_l = D/\chi$) [88], siendo D el coeficiente de difusión lateral del poro insertado en la membrana. El último término corresponde a un campo longitudinal estocástico que correlaciona según $\langle \xi_{th}(t) \xi_{th}(t') \rangle = 2\xi_{th} k_B T \Lambda_l(q) \delta(t - t')$.

Las ecuaciones 28 y 29 describen la dinámica de dos procesos elementales en dos escalas de tiempo diferentes:

- a) Fluctuaciones transversales $h(q, t)$ descritas como desviaciones de curvatura generadas por la tensión de membrana y la elasticidad de curvatura (algo afectados por la permeabilidad).
- b) Transporte longitudinal a través de los poros $\phi(q, t)$, el cual determina la escala de tiempo a la cual las fluctuaciones por la densidad de poros pueden modificar la distribución de los puntos "activos" permeables a lo largo de la membrana.

Cuando las soluciones forman ondas planas (por ejemplo, si el gradiente osmótico está totalmente equilibrado por la permeabilidad de los poros, $\Delta\Pi \approx -\rho_0 F_0 \phi$, para el modo de curvatura podría esperarse una tasa de relajación [88]:

$$\tau_h^{-1} = \left(\lambda + \frac{1}{4\eta q} \right) (\sigma q^2 + \kappa_{eff}^{\Xi} q^4) + \rho_0 \lambda F_p' q^2 \quad (30)$$

y para el modo más lento de difusión a través del poro[88]:

$$\tau_{\phi}^{-1} \approx \Lambda_l \chi q^2 \approx D q^2 \quad (31)$$

Como consecuencia, para tamaños de poro grandes ($D < 10^{-12} \text{m}^2/\text{s}$), se esperan unas tasas de relajación difusional mucho más lentas para ser detectadas en la ventana de tiempo accesible experimentalmente ($\tau_{\phi}^{-1} \gg 1 \text{ sg}$ para espectroscopía de flickering en vesículas gigantes a $q \approx 1 \mu\text{m}^{-1}$; $\tau_{\phi}^{-1} > 100 \mu\text{s}$ para NSE). En el caso de los poros formados por el conector de phi29, la difusividad lateral de la proteína es extremadamente lenta, por lo que no este modo no estará relajado en la ventana de tiempo experimental.

Además, existe otra escala de tiempo relevante para los movimientos de permeabilidad, en un gradiente osmótico $\Delta\Pi$, se esperan unas tasas de flujo estacionario a través de los poros de $r_{est} \approx \lambda \Delta\Pi/w$. Las acumulaciones locales de poros generados por el acoplamiento de curvatura influyen fuertemente en las fluctuaciones de forma a través de la permeabilidad, por lo que la tasa de permeación es dependiente de q y aumenta en función de r_{ϕ} (el cual esta principalmente descrito por la densidad de fluctuaciones ϕ) [88].

Por lo tanto, a partir de todo lo anterior, puede describirse la tasa de transporte de moléculas a través de los poros (tasa permeabilidad) como:

$$\tau_p^{-1} \approx r_{est} + r_{\phi} \approx \lambda \frac{\Delta\Pi}{w} + \rho_0 \frac{w\Xi}{\chi} \lambda F_p q^2 \quad (32)$$

Donde el transporte estacionario (r_{est}) se ve incrementado por el componente "activo" (r_{ϕ}) debido a las fuerzas de reacción implicadas en los eventos de permeabilidad.

3. Virus Bacteriófagos

Los virus son entidades ultramicroscópicas carentes de metabolismo y de sistema reproductivo propio, consecuentemente, están obligadas a invadir un hospedador y parasitar su maquinaria para poder replicarse y mantener su ciclo vital propio. En su forma más básica, están constituidos por un segmento de ácido nucleico atrapado en el interior de una cápsula proteica. A esta entidad, cuando se encuentra en forma libre (fuera de un hospedador), se le suele denominar virión, mientras que cuando entra en fase de infección, se les suele denominar virus.

3.1 Historia y Diversidad:

La virología, como disciplina, es relativamente reciente, no obstante, los efectos de los virus en humanos se conocen desde mucho antes. La primera datación de una enfermedad provocada por un virus se localiza en Menfis, capital del Antiguo Imperio de Egipto, donde se ha encontrado un jeroglífico datado en 3700 a.C en el que se apreciaba la figura de un sacerdote del templo con los signos típicos de una poliomielitis parálitica.

Durante la historia más reciente, se han seguido encontrando signos de enfermedades causadas por diferentes agentes virales, pero no es hasta la llegada de la técnica de la mano de Leeuwenhoek (aparición del microscopio), los razonamientos Koch (postulados de Koch, 1880) e investigaciones de Pasteur (investigaciones con la rabia, 1880) hasta que se propone la existencia de los <<virus>> (<<veneno>> en latín) como causante de las mismas, eso sí, sin hacer distinción entre virus o bacterias.

En 1892, Iwanowski, sin saber explicar el porqué de sus resultados, consiguió transmitir la enfermedad desde plantas enfermas a plantas sanas tras hacer pasar sus extractos por filtros con orificios lo suficientemente finos como para retener las bacterias más pequeñas conocidas hasta la época. Beijerinck, posteriormente, en 1898, siguiendo los pasos de Iwanowski con el virus del mosaico del tabaco (VMT), consiguió desarrollar el concepto moderno de virus, al cual describió como “germen vivo soluble”. Más tarde, otros investigadores, demostraron la existencia de un agente similar que actuaba sobre animales, pero la sociedad de la época no aceptó que podría ser el causante de enfermedades en humanos, postura obligada a variar en 1909,

cuando Landsteiner y Popper confirmaron que la poliomielitis en humanos era causada también por un agente filtrable. Años después, Twort (1915) y d'Herelle (1917) llegaron al descubrimiento de los bacteriófagos, o virus que infectan bacterias, lo cual constituyó el estímulo necesario para la integración de la virología como ciencia unificada [89].

Hasta 1970, la microbiología medioambiental estudiaba la diversidad de los entornos directamente a través de cultivos de muestras capturadas en diferentes entornos. Mediante este procedimiento, la conclusión a la que se llegaba, era que estos entornos contenían pocos microbios, lo cual se debía principalmente a que no existía una separación entre microbios, virus y bacterias, por lo que en el momento de observar las placas con los resultados, el crecimiento en las mismas era poco fructífero. A partir de la introducción del método de “cuento directo” por Hobbie *et al*[90]., se llegó a la estimación de que las cantidades se habían subestimado entre unas 100-1000 veces. Este método consistía en el filtrado de una muestra de agua a través de poros de 0.02 μm para concentrar los microbios y virus, y la posterior visualización de los mismos por microscopía de epifluorescencia [90]. Gracias a estos estudios, se ha observado que los microbios y virus son los mayores intermediarios en el ciclo del carbono. En el océano, por ejemplo, al menos el 50% del CO_2 fijado por fotosíntesis cada día es soportado por respiración microbiana [91].

Se estima que existen unos 10^{31} unidades virales en la tierra, dentro de los cuales, los más abundantes, son los virus bacteriófagos, o lo que es lo mismo, virus que utilizan como hospedador una bacteria [91]. Se estima que la gran mayoría de estos microbios se corresponde con bacteriófagos ya que las principales presas de los mismos corresponden a bacterias.

Clasificación:

Los virus bacteriófagos incluyen un orden, 14 familias aceptadas y al menos 5 posibles familias más esperando para ser clasificadas. La mayoría de los bacteriófagos conocidos hasta la fecha pertenecen al orden de los *Caudovirales* (96%), y poseen una cápside o cabeza de composición proteica, con simetría icosaédrica que está unida, a través de un cuello, a una cola cuya longitud y capacidad de contracción sirven para diferenciar tres familias: *Myoviridae*, con colas contráctiles compuestas por una vaina y un tubo central, *Siphoviridae* con colas largas, no contráctiles y *Podoviridae* con colas cortas. En el extremo de la cola se encuentran frecuentemente estructuras de fijación a la célula hospedadora como placas basales, espinas o fibras. Sin embargo, su tamaño

se encuentra cerca del límite de resolución del microscopio electrónico dificultando su estudio [92, 93].

3.2 Virus bacteriófago phi29

El virus bacteriófago phi29 pertenece a la familia *Podoviridae* e infecta a *Bacillus subtilis*. Se caracteriza por poseer un ADN de doble hebra lineal de 19,3 Kb, el cual contiene asociado en sus extremos 5' una proteína terminal gp3 [93].

3.2.1 Morfogénesis

Mientras que la mayoría de los virus eucariotas requieren muchas partículas para comenzar con éxito una infección, phi29 requiere la asociación de una sola partícula a un receptor de la pared celular del hospedador que genera un cambio conformacional en la cola del mismo y que posibilita la salida hacia el citoplasma del complejo genómico ADN-gp3[94].

Una vez en el citoplasma, junto la replicación del genoma, nuevos componentes virales son generados y comenzando la morfogénesis de nuevos viriones. La primera estructura ensamblada durante la morfogénesis consiste en una precabeza con forma prolato de 54 nm de largo y 42 nm de ancho, la cual monta a su vez una máquina de empaquetamiento.

La procabeza está formada por la proteína de la cápside mayor gp8, la proteína de andamiaje gp7, y proteínas de la fibra principal gp 8.5 y el cuello está compuesto por un cuello superior o conector cabeza cola (gp10), el cual consiste en un oligómero con simetría 12 necesario para el ensamblaje entre la cabeza y el collar menor (gp11) con 12 apéndices en forma de huso. Estos apéndices son necesarios para la adsorción del fago a la pared celular bacteriana. La configuración de la cola está formada por la proteína gp9 [95] (Ver Fig. 11).

La estructura del conector puede dividirse en tres regiones, un extremo ancho de 69 Å, una región central de 47 Å y un extremo estrecho de 33 Å (de radio), las cuales, hacen que el conector tenga una altura total de 75 Å. El canal interno del conector tiene un diámetro de que va desde 36 Å en el lado estrecho hasta 60 Å en el lado más ancho [96].

Introducción

El extremo ancho, con una simetría de 12 es la zona que queda enterrada dentro de la procabeza, mientras que el extremo estrecho, con una simetría aparente de 6, sobresale de la estructura de la precabeza.

Rodeando al conector, en su zona estrecha, se localiza un pequeño ARN específico (pRNA), el cual conforma un anillo con forma de pentámero con un diámetro similar a este extremo del conector y formando junto a éste una estructura de doble anillo.

Esta estructura, junto con la ayuda de una proteína con actividad ATPasa o terminasa gp16 y ATP, es capaz de bombear activamente el complejo ADN-gp3 en el interior de las procabezas de manera efectiva. Este motor puede funcionar generar fuerzas de hasta 57 pN, lo cual lo convierte en uno de los motores moleculares más potentes descubiertos en este tipo de bacteriófagos. El proceso de bombeo consume una molécula de ATP por cada 2.5 pb de ADN[97].

Durante el embalaje, la procabeza se hace más angular y rígida, y la proteína de andamiaje gp7 es liberada. Cuando termina el empaquetamiento del ADN, parte de esa máquina de translocación es desensamblada, liberándose secuencialmente la terminasa gp16, el pRNA, lo cual permite una fijación secuencial de los componentes de la cola.

Durante la fijación de la cola, el cuello gp11, la cola gp9 y los apéndices gp12 son montados secuencialmente, ayudando a mantener el ADN en el interior de la cabeza [93, 94].

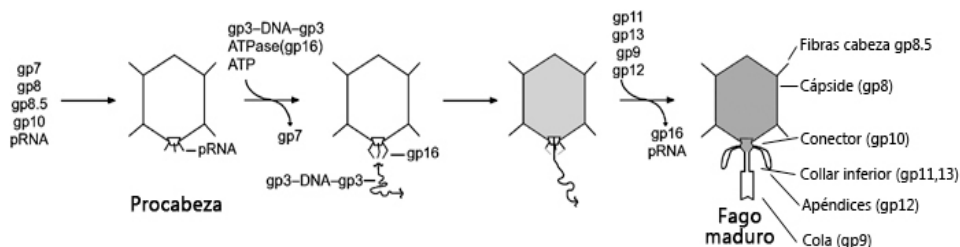


Fig. 11. Proceso de ensamblado simplificado del bacteriófago phi29 durante su morfogénesis. (Imagen adaptada de *Tao et al* [94])

3.2.2 Conector

Como se ha comentado anteriormente, el conector de phi29 es una estructura clave que juega varios papeles durante la morfogénesis (formación de la procabeza, empaquetamiento del ADN-gp3, maduración de la cola). Se trata de una proteína oligomérica de 422 kDa formada a partir del ensamblaje específico de 12 monómeros de la proteína gp10. Cada monómero se compone de un dominio central, constituido principalmente por hélices α , un dominio distal α/β (zona tallada) y un dominio SH3 proximal (zona alada) compuesto de 6 láminas. Durante el ensamblaje de estos monómeros, se genera un canal interno central de 35 Å, a través del cual el ADN es transportado hacia el interior de la precabeza. La superficie interna de este canal es principalmente electronegativa, pero incluye cuatro anillos de carga positiva de lisina (Lys200, Lys209, Lys234 y Lys235) separados entre sí una distancia de 20 Å.

La mayor parte de la superficie externa está constituida de aminoácidos hidrofílicos, confiriendo al conector una gran solubilidad incluso en condiciones de alta fuerza iónica, pero en detalle, pueden apreciarse diferentes zonas. En el extremo ancho (dominio SH3) se observa una zona cargada tanto positiva, como negativamente por residuos polares. Seguido a ese dominio, en la zona cóncava debajo del dominio SH3, se localiza un cinturón hidrofóbico (o lipofílico) formando una corona que interacciona con la zona de la procabeza, la cual incluye, Phe24, Ile25, Leu28, Phe60, Phe128, Pro129 y Pro132.

Tras esta zona, en la zona ecuatorial se encuentra otra área con cargas positivas y negativas mezcladas en las que caben destacar los aminoácidos Arg17, Arg22 y Lys172. Más abajo, en la zona proximal, o extremo estrecho, se localiza un anillo con residuos Asn y Gln. Esta zona abarca una gran concentración de residuos con cadenas laterales que contienen grupos amida, incluyendo Asn166, Asn167, Gln168, Gln173, Asn176 y Gln177. Finalmente, en el extremo apical del conector, el que rodea la entrada al canal, se localiza un anillo de carácter ácido formado por las cadenas laterales de los aminoácidos Glu189, Asp192 y Asp194 [98].

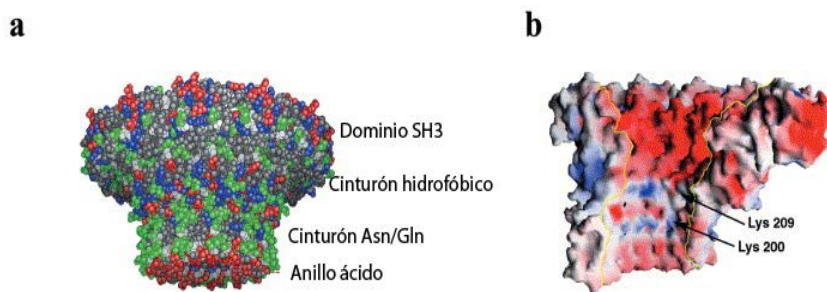


Figura 12. a) Modelo atómico del conector p10. Código de colores para las cadenas laterales: Asn/Gln (verde), Asp/Glu (rojo), cinturón hidrofóbico (gris), Lys/Arg (Azul). b) Superficie molecular de color en función del potencial electrostático: Negativo (rojo), positivo (azul). (Imagen adaptada de Carrascosa *et al* [98])

3.2.3 Localización y posible papel de la pRNA

El pRNA es una molécula pequeña de 174 nucleótidos necesaria para la interacción entre la terminasa (gp16) y el conector. Como se ha comentado anteriormente, el cinturón de pRNA se ensambla en forma de anillo pentamérico (2-3 nm de altura) sobre el vértice más externo del conector. En cada monómero de este anillo pentamérico se ha observado que existen dos zonas funcionales de asociación, una zona de unión a la precabeza a partir de la región N-terminal del conector y un dominio vinculante para la asociación de la terminasa gp16 [99-101].

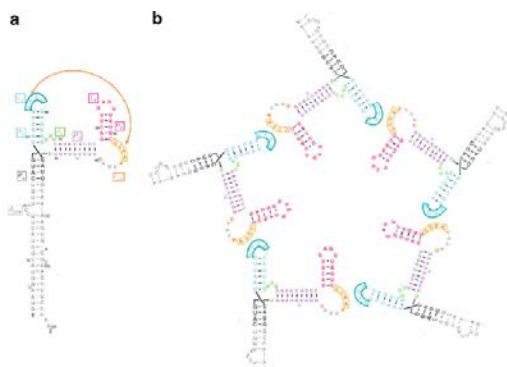


Figura 13. Estructura del pARN y formación del pentámero A) Secuencia y estructura secundaria del pARN con dos dominios, el dominio de unión al conector y el dominio de translocación del ADN,. (B) Diagramas para la formación de un anillo pentamérico de pARN. (Imagen adaptada del libro Rossmann *et al*[102].

3.2.4 Localización y función de la ATPasa p16

La terminasa gp16 (39 kDa) es una enzima de empaquetamiento con actividad ATPasa. Esta actividad ATPasa es la encargada de proporcionar el movimiento físico del ADN a través de la hidrólisis de ATP [93]. Dentro del complejo motor molecular se ensambla a partir de dímeros formando un anillo pentamérico que interacciona con el anillo de pRNA a través de sus regiones conservadas 5'-3' [103]. Se ha sugerido que esta enzima pertenece a la superfamilia de las proteínas AAA+ (ATPasas Asociadas con Actividades celulares variadas); las funciones que se les atribuyen a estas enzimas, así como su clasificación son muy variadas, podemos encontrarnos funciones en la degradación de proteínas, replicación del ADN, termotolerancia (en bacterias, hongos y plantas), fusión de membranas y movimiento de motores sobre microtúbulos en células eucariotas)[104, 105].

Dentro de la enzima gp16, se han localizado los motivos walker A y walker B (los cuales están en concordancia con pertenecer a la superfamilia AAA+)[104]. La unión de ATP induce un cambio en gp16 que le provoca alta afinidad por el ADN. Una vez ese ATP es hidrolizado, gp16 sufre otro cambio conformacional que produce una fuerza externa que impulsa el ADN hacia el interior del motor. La proteína interactúa transitoriamente con la procabeza durante el empaquetamiento, pero no está presente en la partícula viral final [95].

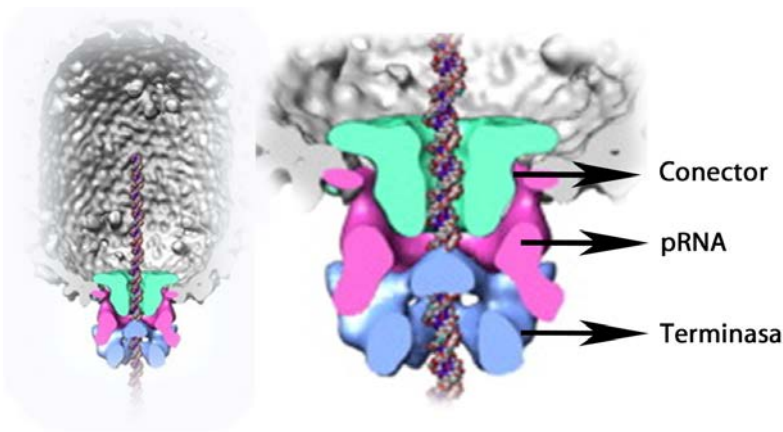


Figura 14. Complejo de empaquetamiento de phi29. Imagen adaptada de Grimes et al [106].

Bibliografía

1. Hofmeyr, J.-H.S. and H.V. Westerhoff, *Building the Cellular Puzzle: Control in Multi-level Reaction Networks*. Journal of Theoretical Biology, 2001. **208**(3): p. 261-285.
2. Pengcheng Fu, S.P., ed. *Systems Biology and Synthetic Biology*. 2009, John Wiley & Sons. 704.
3. McDaniel, R. and R. Weiss, *Advances in synthetic biology: on the path from prototypes to applications*. Current Opinion in Biotechnology, 2005. **16**(4): p. 476-483.
4. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2005: American Scientific Publishers.
5. Drexler, K.E., *Engines of Creation*. 1996: Fourth Estate Limited.
6. Gazit, E., *Plenty of Room for Biology at the Bottom: An Introduction to Bionanotechnology*. 2007: Imperial College Press.
7. Reisner, D.E., *Bionanotechnology: Global Prospects*. 2008: Taylor & Francis.
8. Renugopalakrishnan, V. and R.V. Lewis, *Bionanotechnology: Proteins to Nanodevices*. 2006: Springer London, Limited.
9. LeDuc, P.R., *Towards an in vivo biologically inspired nanofactory*. Nat Nano, 2007.
10. Hosta-Rigau, L., et al., *Capsosomes with "Free-Floating" Liposomal Subcompartments*. Advanced Materials, 2011. **23**(35): p. 4082-4087.
11. Städler, B., et al., *A Microreactor with Thousands of Subcompartments: Enzyme-Loaded Liposomes within Polymer Capsules*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(24): p. 4359-4362.
12. Kulygin, O., et al., *Subcompartmentalized Polymer Hydrogel Capsules with Selectively Degradable Carriers and Subunits*. Small, 2010. **6**(14): p. 1558-1564.
13. Chandrawati, R., et al., *Degradation of liposomal subcompartments in PEGylated capsosomes*. Soft Matter, 2011. **7**(20): p. 9638-9646.
14. Franklin, B., W. Brownrigg, and M. Farish, *Of the Stilling of Waves by means of Oil. Extracted from Sundry Letters between Benjamin Franklin, LL. D. F. R. S. William Brownrigg, M. D. F. R. S. and the Reverend Mr. Farish*. Philosophical Transactions, 1774. **64**: p. 445-460.
15. Tanford, C., *Ben Franklin Stilled the Waves: An Informal History of Pouring Oil on Water with Reflections on the Ups and Downs of Scientific Life in General*. 2004: OUP Oxford.

16. Bar, R.S., D.W. Deamer, and D.G. Cornwell, *Surface area of human erythrocyte lipids: reinvestigation of experiments on plasma membrane*. Science, 1966. **153**(3739): p. 1010-2.
17. Sadava, D.E., *Cell biology: organelle structure and function*. 1993: Jones and Bartlett Publishers.
18. Danielli, J.F. and H. Davson, *A contribution to the theory of permeability of thin films*. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 1935. **5**(4): p. 495-508.
19. Weissmann, G. and R. Claiborne, *Cell membranes: biochemistry, cell biology, & pathology*. 1975: HP Pub. Co.
20. Green, D.E. and J.F. Perdue, *Membranes as expressions of repeating units*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1966. **55**(5): p. 1295-1302.
21. Robertson, J.D., *New Observations on the Ultrastructure of the Membranes of Frog Peripheral Nerve Fibers*. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1957. **3**(6): p. 1043-1048.
22. Hianik, T. and V.I. Passechnik, *Bilayer Lipid Membranes. Structure and Mechanical Properties*. 1995: Springer.
23. *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*. Science (New York, N.Y.), 1972. **175**(4023): p. 720-731.
24. Lodish, H., *Molecular Cell Biology*. 2008: W. H. Freeman.
25. Singer, S.J., *Some Early History of Membrane Molecular Biology*. Annual Review of Physiology, 2004. **66**(1): p. 1-27.
26. Jones, M.N. and D. Chapman, *Micelles, Monolayers, and Biomembranes*. 1994: Wiley.
27. Alberts, B., *Essential cell biology*. 2009: Garland Science.
28. Nelson, D.D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2013: W.H. Freeman.
29. Meer, G.V., *Lipid Traffic in Animal Cells*. Annual Review of Cell Biology, 1989. **5**(1): p. 247-275.
30. Vance, J.E. and D.E. Vance, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 2008: Elsevier Science.
31. Lasic, D.D. and F.J. Martin, *On the mechanism of vesicle formation*. Journal of Membrane Science, 1990. **50**(2): p. 215-222.
32. Bangham, A.D. and R.W. Horne, *Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope*. Journal of Molecular Biology, 1964. **8**(5): p. 660-IN10.

33. Bangham, A.D., M.M. Standish, and J.C. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. Journal of Molecular Biology, 1965. **13**(1): p. 238-IN27.
34. Hauser, H. and N. Gains, *Spontaneous vesiculation of phospholipids: a simple and quick method of forming unilamellar vesicles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982. **79**(6): p. 1683-1687.
35. Lasic, D.D., *The mechanism of vesicle formation*. Biochemical Journal, 1988. **15**(256(1)): p. 1-11.
36. Woodle, M.C. and D. Papahadjopoulos, *Liposome preparation and size characterization*. Methods Enzymol, 1989. **171**: p. 193-217.
37. Huang, C.-H., *Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics*. Biochemistry, 1969. **8**(1): p. 344-352.
38. Hamilton, R.L., et al., *Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique*. Journal of Lipid Research, 1980. **21**(8): p. 981-92.
39. Nozaki, Y., D. Lasic, and J. Tanford, *Size analysis of phospholipid vesicle preparations*. Science, 1982. **217**(4557): p. 366-367.
40. Deamer, D. and A.D. Bangham, *Large volume liposomes by an ether vaporization method*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1976. **443**(3): p. 629-634.
41. Szoka, F. and D. Papahadjopoulos, *Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978. **75**(9): p. 4194-4198.
42. Reeves, J.P. and R.M. Dowben, *Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles*. Journal of Cellular Physiology, 1969. **73**(1): p. 49-60.
43. Reeves, J.P. and R.M. Dowben, *Water permeability of phospholipid vesicles*. The Journal of Membrane Biology, 1970. **3**(1): p. 123-141.
44. Moscho, A., et al., *Rapid preparation of giant unilamellar vesicles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(21): p. 11443-11447.
45. Angelova, M.I., et al., *Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications*, in *Trends in Colloid and Interface Science VI*, C. Helm, M. Lösche, and H. Möhwald, Editors. 1992, Steinkopff. p. 127-131.
46. Méléard, P., L.A. Bagatolli, and T. Pott, *Chapter 9 - Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: From Lipid Mixtures to Native Membranes Under Physiological Conditions*, in *Methods in Enzymology*, D. Nejat, Editor. 2009, Academic Press. p. 161-176.

47. Zeman, K., H. Engelhard, and E. Sackmann, *Bending undulations and elasticity of the erythrocyte membrane: effects of cell shape and membrane organization*. European Biophysics Journal, 1990. **18**(4): p. 203-219.
48. Lipowsky, R. and M. Girardet, *Shape fluctuations of polymerized or solidlike membranes*. Physical Review Letters, 1990. **65**(23): p. 2893-2896.
49. Boal, D.H., *Mechanics of the Cell*. 2002: Cambridge University Press.
50. Spivak, M., *A Comprehensive Introduction to Differential Geometry*. 1975: Publish or Perish, Incorporated.
51. Helfrich, W., *Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments*. Z. Naturforsch, 1973. **28**(11): p. 693-703.
52. Helfrich, W. and R.M. Servuss, *Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes*. Il Nuovo Cimento D, 1984. **3**(1): p. 137-151.
53. Lin, L.C. and F.L. Brown, *Dynamic simulations of membranes with cytoskeletal interactions*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2005. **72**(1 Pt 1): p. 19.
54. Reister-Gottfried, E., S.M. Leitenberger, and U. Seifert, *Hybrid simulations of lateral diffusion in fluctuating membranes*. Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics, 2007. **75**(1 Pt 1): p. 011908.
55. Seifert, U., *Configurations of Fluid Membranes and Vesicles*. 1997: Max-Planck-Inst. für Kolloid- und Grenzflächenforschung.
56. Seifert, U., *Fluid membranes in hydrodynamic flow fields: Formalism and an application to fluctuating quasispherical vesicles in shear flow*. The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems, 1999. **8**(3): p. 405-415.
57. García, R., et al., *Bimodal Spectrum for the Curvature Fluctuations of Bilayer Vesicles: Pure Bending plus Hybrid Curvature-Dilation Modes*. Physical Review Letters, 2009. **102**(12): p. 128101.
58. Seifert, U., K. Berndl, and R. Lipowsky, *Shape transformations of vesicles: Phase diagram for spontaneous- curvature and bilayer-coupling models*. Phys Rev A, 1991. **44**(2): p. 1182-1202.
59. Seifert, U. and S.A. Langer, *Viscous Modes of Fluid Bilayer Membranes*. EPL (Europhysics Letters), 1993. **23**(1): p. 71.
60. Helfrich, W., *Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments*. Z Naturforsch C, 1973. **28**(11): p. 693-703.
61. Jenkins, J.T., *Static equilibrium configurations of a model red blood cell*. J Math Biol 1977. **4**(2): p. 149-69.

62. Schneider, M.B., J.T. Jenkins, and W.W. Webb, *Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles*. J. Phys. France, 1984. **45**(9): p. 1457-1472.
63. Boal, D. and D.H. Boal, *Mechanics of the Cell*. 2012: Cambridge University Press.
64. Ross-Murphy, S.B., *Dynamic Light Scattering*. B. J. Berne and R. Pecora, John Wiley, New York, 1976, pp. 376. Price £16.50. British Polymer Journal, 1977. **9**(2): p. 177-177.
65. Lovesey, S.W. and P. Schofield, *Inelastic coherent neutron scattering by small particles*. Journal of Physics C: Solid State Physics, 1976. **9**(15): p. 2843.
66. Milner, S.T. and S.A. Safran, *Dynamical fluctuations of droplet microemulsions and vesicles*. Physical Review A, 1987. **36**(9): p. 4371-4379.
67. Arriaga, L.R., et al., *Stiffening Effect of Cholesterol on Disordered Lipid Phases: A Combined Neutron Spin Echo + Dynamic Light Scattering Analysis of the Bending Elasticity of Large Unilamellar Vesicles*. Biophysical Journal, 2009. **96**(9): p. 3629-3637.
68. Arriaga, L.R., et al., *Dissipative curvature fluctuations in bilayer vesicles: Coexistence of pure-bending and hybrid curvature-compression modes*. The European Physical Journal E, 2010. **31**(1): p. 105-113.
69. Woodka, A.C., et al., *Lipid Bilayers and Membrane Dynamics: Insight into Thickness Fluctuations*. Physical Review Letters, 2012. **109**(5): p. 058102.
70. Zilman, A.G. and R. Granek, *Undulations and Dynamic Structure Factor of Membranes*. Physical Review Letters, 1996. **77**(23): p. 4788-4791.
71. Granek, R., *Membrane surrounded by viscoelastic continuous media: anomalous diffusion and linear response to force*. Soft Matter, 2011. **7**(11): p. 5281-5289.
72. Zilman, A.G. and R. Granek, *Membrane dynamics and structure factor*. Chemical Physics, 2002. **284**(1-2): p. 195-204.
73. Granek, R., *From Semi-Flexible Polymers to Membranes: Anomalous Diffusion and Reptation*. J. Phys. II France, 1997. **7**(12): p. 1761-1788.
74. Van Kampen, N.G., *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*. 1992: Elsevier Science.
75. Iñiguez-Palomares, R., H. Acuña-Campa, and A. Maldonado, *Effect of polymer on the elasticity of surfactant membranes: A light scattering study*. Physical Review E, 2011. **84**(1): p. 011604.
76. Nagao, M., et al., *Temperature and pressure effects on structural formations in a ternary microemulsion*. Journal of Applied Crystallography, 2000. **33**(3 Part 1): p. 653-656.
77. Mihailescu, M., et al., *Dynamics of bicontinuous microemulsion phases with and without amphiphilic block-copolymers*. The Journal of Chemical Physics, 2001. **115**(20): p. 9563-9577.

78. Yi, Z., M. Nagao, and D.P. Bossev, *Bending elasticity of saturated and monounsaturated phospholipid membranes studied by the neutron spin echo technique*. J Phys Condens Matter, 2009. **21**(15): p. 0953-8984.
79. Farago, B., et al., *Dynamics of microemulsions as seen by neutron spin echo*. Physica B: Condensed Matter, 1995. **213–214**(0): p. 712-717.
80. Komura, S., et al., *Dynamical fluctuation of the mesoscopic structure in ternary $C_{12}E_5$ -water-n-octane amphiphilic system*. Physical Review E, 2001. **63**(4): p. 041402.
81. Imai, M., et al., *Inter-lamellar interactions modulated by addition of guest components*. The European Physical Journal E, 2004. **13**(4): p. 391-400.
82. Watson, M.C. and Frank L.H. Brown, *Interpreting Membrane Scattering Experiments at the Mesoscale: The Contribution of Dissipation within the Bilayer*. Biophysical Journal, 2010. **98**(6): p. L9-L11.
83. Watson, M.C., et al., *The intermediate scattering function for lipid bilayer membranes: From nanometers to microns*. The Journal of Chemical Physics, 2011. **135**(19): p. 194701-13.
84. Kraus, M. and U. Seifert, *Relaxation modes of an adhering bilayer membrane*. J. Phys. II France, 1994. **4**(7): p. 1117-1134.
85. Alberts, B., et al., *Introduccion a la Biologia Celular / Essential Cell Biology*. 2011: Editorial Medica Panamericana Sa de.
86. Houslay, M.D. and K.K. Stanley, *Dynamics of biological membranes: influence on synthesis, structure, and function*. 1982: Wiley.
87. Lipowsky, R. and E. Sackmann, *Structure and Dynamics of Membranes: I. From Cells to Vesicles / II. Generic and Specific Interactions*. 1995: Elsevier Science.
88. Manneville, J.B., et al., *Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2001. **64**(2 Pt 1): p. 24.
89. Knipe, D.M., P.M. Howley, and D.E. Griffin, *Fundamental Virology*. 2001: Lippincott Williams & Wilkins.
90. Hobbie, J.E., R.J. Daley, and S. Jasper, *Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy*. Appl Environ Microbiol, 1977. **33**(5): p. 1225-8.
91. Breitbart, M. and F. Rohwer, *Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?* Trends Microbiol, 2005. **13**(6): p. 278-84.
92. Mc Grath, S., et al., *Anatomy of a lactococcal phage tail*. J Bacteriol, 2006. **188**(11): p. 3972-82.
93. Meijer, W.J., J.A. Horcajadas, and M. Salas, *Phi29 family of phages*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(2): p. 261-87.

94. Tao, Y., et al., *Assembly of a Tailed Bacterial Virus and Its Genome Release Studied in Three Dimensions*. Cell, 1998. **95**(3): p. 431-437.
95. Bjornsti, M.A., B.E. Reilly, and D.L. Anderson, *Morphogenesis of bacteriophage phi 29 of Bacillus subtilis: DNA-gp3 intermediate in vivo and in vitro assembly*. Journal of Virology, 1982. **41**(2): p. 508-517.
96. Cuervo, A. and J.L. Carrascosa, *Viral connectors for DNA encapsulation*. Curr Opin Biotechnol, 2012. **23**(4): p. 529-36.
97. Smith, D.E., et al., *The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 748-52.
98. Guasch, A., et al., *Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage ϕ 29 connector particle*. Journal of Molecular Biology, 2002. **315**(4): p. 663-676.
99. Guo, P., et al., *Inter-RNA Interaction of Phage ϕ 29 pRNA to Form a Hexameric Complex for Viral DNA Transportation*. Molecular Cell, 1998. **2**(1): p. 149-155.
100. Shu, Y., et al., *Assembly of multifunctional phi29 pRNA nanoparticles for specific delivery of siRNA and other therapeutics to targeted cells*. Methods, 2011. **54**(2): p. 204-14.
101. Ding, F., et al., *Structure and assembly of the essential RNA ring component of a viral DNA packaging motor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011.
102. Rossmann, M.G. and V.B. Rao, *Viral Molecular Machines*. 2012: Springer.
103. Lee, T.-J. and P. Guo, *Interaction of gp16 with pRNA and DNA for Genome Packaging by the Motor of Bacterial Virus phi29*. Journal of Molecular Biology, 2006. **356**(3): p. 589-599.
104. Schwartz, C., et al., *Revolution rather than rotation of AAA+ hexameric phi29 nanomotor for viral dsDNA packaging without coiling*. Virology, (0).
105. Schwartz, C., et al., *The ATPase of the phi29 DNA packaging motor is a member of the hexameric AAA+ superfamily*. Virology, 2013. **22**(13): p. 00198-0.
106. Grimes, S., et al., *Role of ϕ 29 Connector Channel Loops in Late-Stage DNA Packaging*. Journal of Molecular Biology, 2011. **410**(1): p. 50-59.

OBJETIVO

2. Objetivo

El paso de ácidos nucleicos a través de diferentes compartimentos biológicos es un acontecimiento fundamental en diferentes aspectos de los ciclos celulares, como por ejemplo, el transporte de mARN desde el núcleo al citoplasma, la comunicación celular, infecciones víricas, etc. En la mayoría de los casos, este paso entre diferentes compartimentos es posible gracias a la existencia de poros macromoleculares que funcionan como nanomáquinas específicas. El paso de estas moléculas nucleicas a través de los poros debe superar una serie de problemas básicos para el desplazamiento eficiente como por ejemplo la extensión de los polímeros de ácidos nucleicos, así como su alta rigidez intrínseca.

El objetivo de esta tesis está basado en la construcción de un dispositivo sintético de compactación de ADN de manera activa. En el presente manuscrito se mostrarán los primeros pasos hacia su obtención, comenzando con la creación de la cubierta, la cual estará basada en membranas lipídicas adaptadas mediante una estrategia de compatibilización con la superficie del conector del virus phi29, de modo que se intentará su integración a forma de poros con posibles perspectivas a su actividad controlada.

Cabe resaltar, que esta idea, como tal, no es del todo novedosa, en recientes estudios, el Profesor Peixuan Guo, director del “*NIH Nanomedicine Development Center: Phi29 DNA-Packaging Motor for Nanomedicine*” ha centrado sus esfuerzos en la integración sintética de los conectores de Phi29 en bicapas lipídicas. En sus trabajos, esta inserción fue realizada mediante una modificación directa sobre las proteínas del conector convirtiéndolas en superficies más hidrofóbicas, las cuales fueron posteriormente incubadas en presencia de lípidos neutros. Mediante esta técnica, el Dr. Guo fue capaz de realizar exitosamente la integración de estos componentes en membranas, aunque con bajas tasas de eficiencia en su inserción [1-4].

Mediante esta tesis, proponemos una metodología sintética alternativa basándonos en la adaptación de las membranas lipídicas a estas superficies para llevar a cabo la integración óptima y eficiente de esta molécula, para ello, nos apoyaremos en la siguiente estrategia de compatibilización.

Estrategia de compatibilización

En busca de la creación de una membrana adaptada acorde con la superficie del conector *p10*, en esta tesis nos hemos basado en el aprovechamiento de los residuos situados en las cadenas laterales expuestas de los aminoácidos que conforman los oligómeros y su capacidad reactiva. Para ello, concretamente nos hemos centrado en el estudio de los residuos básicos expuestos, los cuales, según se ha comentado antes en el apartado 3.2.2 en el capítulo de Introducción, corresponden principalmente al cinturón hidrofóbico conformado Phe24, Ile25, Leu28, Phe60, Phe128, Pro129 y Pro132, al cinturón conformado por Arg17, Arg22, y Lys172 en la zona ecuatorial, así como los aminoácidos Asn y Gln concentrados en las porciones distales (ver Fig. 1). Todos estos residuos confieren carácter hidrofílico al área del tallo, pero son susceptibles de actuar como residuos básicos con potencial reacción ácido-base.

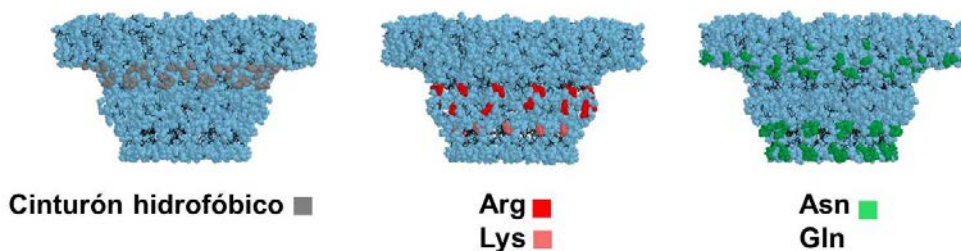


Figura 1. Distribución axi-simétrica de los aminoácidos relevantes expuestos en la superficie del dodecámero. Cinturón hidrofóbico (izq.), aminoácidos básicos (Arg/Lys) (centro) y aminoácidos hidrofílicos con carga positiva (Asn/Gln) (derecha).

En entornos ácidos, neutros e incluso básicos el grupo guanidinio de la arginina (Ver Fig. 1, b) (pK 13.6) se encuentra cargado de forma positiva (Ver Fig. 2). Esto es debido a la conjugación entre el doble enlace y los pares solitarios de nitrógeno; en esta situación, esta carga positiva se deslocaliza, permitiendo un estado intermedio de moléculas de hidrógeno, lo que les hace ser muy reactivos con los grupos carboxílicos a un pH moderadamente básico (pH 8).

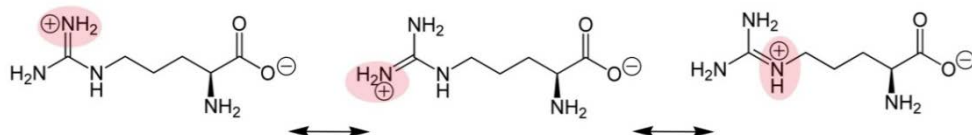


Figura 2. Esquema molecular de la deslocalización de la carga positiva en el aminoácido arginina.

Dentro de este cinturón conformado por residuos de arginina y lisina, en el caso de los residuos de Lys, la reactividad de sus aminas primarias también actúa como base, pero su reactividad difiere a la de los residuos de arginina al tratarse de una base más débil, de modo que también puede interactuar con los grupos carboxilo, pero en menor medida (Ver Fig. 3).



Figura 3. Esquema molecular comparativo de los aminoácidos básicos lisina y arginina y sus respectivos grupos funcionales (rosa) localizados en las cadenas laterales (amarillo).

Tras tener en cuenta estas posibles cargas, como estrategia se utilizaron bicapas adaptadas con la intención de que tengan la capacidad de reaccionar con estos grupos, concretamente, se utilizaron lípidos modificados con un ácido carboxílico en una de sus colas saturadas cortas (C0:9) (1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PAzPC). Estos grupos, a pH moderadamente básico (pH 8) se encuentran desprotonados en la forma negativa de carboxilato, por lo que serían buenos grupos funcionales susceptibles de reaccionar con esas superficies.

Los fosfolípidos oxidados con grupos carboxilato en una de sus colas hidrofóbicas están involucrados en el reconocimiento y unión a proteínas [5, 6]. Además, se ha demostrado que proteínas con aminoácidos ricos en grupos amina laterales se unen fuertemente a agregados de lípidos oxidados [7], ya que el descenso del pH en estas reacciones, ha demostrado que disminuye la reactividad de estos grupos [8, 9] (en esta situación el grupo carboxilato vuelve a estar protonado). Debido a su estructura compleja (una de las cadenas hidrofóbicas más corta y polar), estos lípidos alteran las propiedades físicas de los lípidos de membrana en la bicapa. *Sabatini et al* [10] realizaron isotermas de medición de fuerza-área-superficie junto estudios de microscopía de fluorescencia en monocapas mezcladas con 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), en sus estudios, observaron una expansión total de la monocapa debido a una configuración extendida de las cadenas oxidadas en la fase acuosa, por lo que para bicapas, estos autores sugirieron que la cola hidrofílica debería estar reorientada para llegar a un estado de mínima energía en el que las cadenas cortas con los grupos carboxilato quedan expuestos al medio polar (estos datos también fueron confirmados por *Mouritsen et al* en estudios de dinámica molecular [7]) (Ver Fig. 4).

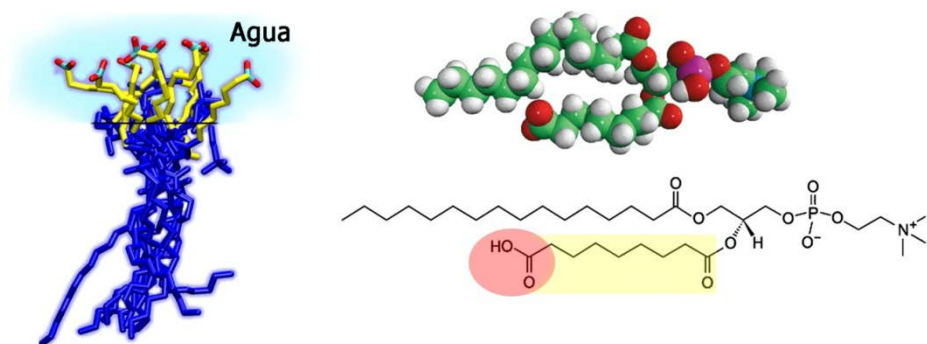


Figura 4. Izquierda: Imagen adaptada de la simulación creada por Mouritsen et al en MD, donde las colas hidrocarbonadas cortas están representadas en amarillo excepto el grupo funcional. El resto de los átomos están representados en azul. La línea negra representa la posición aproximada de los grupos fosfato en una de las capas[7]. Derecha: Esquema molecular de lípido oxidado PAzPC.

En las condiciones de pH moderadamente básico contempladas en esta estrategia, dos cinturones de aminoácidos con carga positiva son localizados también en la superficie del conector, concretamente los aminoácidos asparragina (Asn) y glutamina (Gln) bajo su forma de amonio positivo. Estos dos cinturones están situados en localizaciones distales con respecto a la posición ecuatorial, el primero de ellos a 2,5 nm de la

superficie (En la zona alada) y el segundo en la base del tallo (Ver Fig. 1, c). En comparación con las aminas básicas (Arg, Lys), estas amidas son bases muy débiles y poco reactivas a pH moderadamente básico, pero estas cargas positivas podrían favorecer asociaciones electrostáticas con lípidos de cabezas con carga negativa, como sería el caso de los lípidos con cabeza fosfatidilglicerol, concretamente 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DOPG).

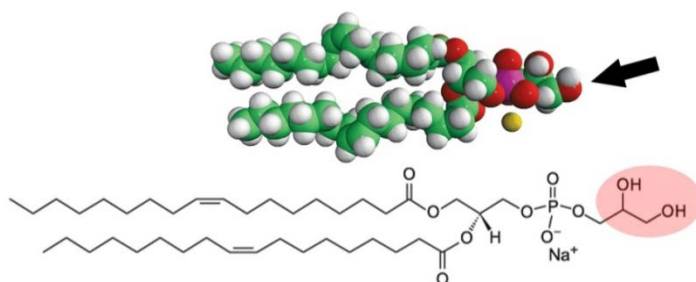


Figura 5. Esquema molecular del lípido 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DOPG).

Debido a todas estas características mencionadas anteriormente, la composición de la bicapa final adaptada a estas superficies estará compuesta por lípidos oxidados en una de sus colas hidrofóbicas (PAzPC), lípidos con cabeza polar con carga negativa (DOPG) y fosfolípidos neutros (con la intención de dar consistencia y fluidez a estas estructuras, concretamente 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) en una relación 10:10:80 (w/v).

De este modo, teniendo en cuenta las cargas superficiales del conector; la disposición del conector de p10 en la bicapa lipídica adaptada debería posicionarse según se representa en la Figura 6. Donde deberían favorecerse interacciones electrostáticas con los lípidos de carga negativa, mientras que los lípidos oxidados con el grupo funcional en una de sus colas hidrofóbicas debería reaccionar covalentemente en estos rangos de pH con el grupo guanidinio del aminoácido arginina a través de un enlace del tipo “-COO-NH-p10”, el cual debería favorecer la acomodación de estas cadenas en la fase hidrofóbica de la bicapa lipídica.

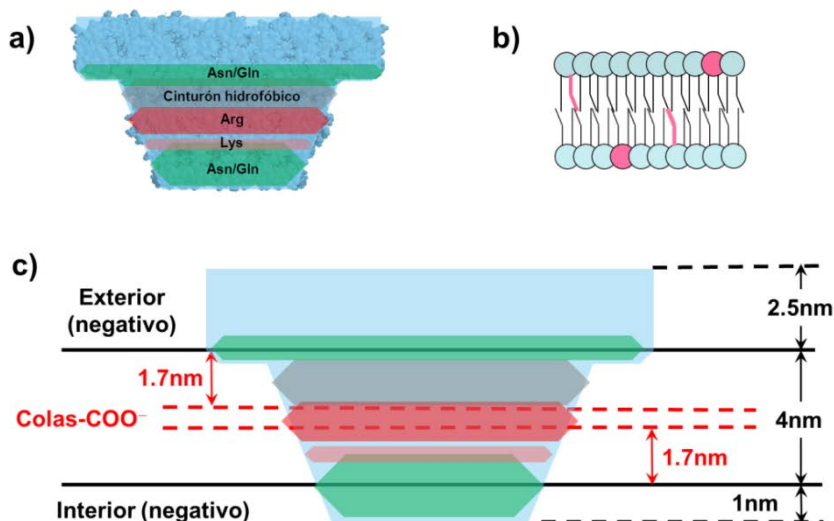


Figura 6. A) Superficie química del conector p10 a pH 8: Cinturón hidrofóbico (gris), residuos de arginina y lisina (rojo), cinturones catiónicos distales (Asn/Gln) (verde). B) Descripción de la composición de la membrana lipídica: DOPC (cabeza azul) mezclado con el lípido oxidado funcional PAzPC (10% m/v)(colas rojas) y el lípido aniónico DOPG (10% m/v). C) Esquema del complejo p10-Bicapa lipídica esperado en esta estrategia: La bicapa lipídica de 4 nm de espesor con los grupos funcionales carboxilatos (COO^-) a una distancia de 1,7 nm de la superficie de la bicapa. El lípido aniónico (DOPG) dota de carga negativa neta en ambas superficies de la bicapa. Estos lípidos interactúan con la proteína mediante (i) interacción electrostática (Asn/Gln-DOPG) a nivel de superficie de la bicapa, (ii) Cinturón hidrofóbico en zona hidrofóbica de la bicapa, (iii) Amidación Arg/Lys-PAzPC en la región central de la bicapa.

1. Wendell, D., et al., *Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores*. Nature nanotechnology, 2009. **4**(11): p. 765-772.
2. Jing, P., et al., *Robust properties of membrane-embedded connector channel of bacterial virus phi29 DNA packaging motor*. Molecular BioSystems, 2010. **6**(10): p. 1844-1852.
3. Haque, F.G., Jia Montemagno, Carlo Guo, Peixuan, *Incorporation of a viral DNA-packaging motor channel in lipid bilayers for real-time, single-molecule sensing of chemicals and double-stranded DNA*. Nat. Protocols, 2013. **8**(2).
4. Shim, J.S., et al., *Formation of lipid bilayers inside microfluidic channel array for monitoring membrane-embedded nanopores of phi29 DNA packaging nanomotor*. Biomed Microdevices, 2012. **14**(5): p. 921-8.
5. Davies, S.S., et al., *Oxidized Alkyl Phospholipids Are Specific, High Affinity Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Ligands and Agonists*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(19): p. 16015-16023.
6. Fruhwirth, G.O., A. Loidl, and A. Hermetter, *Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2007. **1772**(7): p. 718-736.
7. Khandelia, H. and O.G. Mouritsen, *Lipid Gymnastics: Evidence of Complete Acyl Chain Reversal in Oxidized Phospholipids from Molecular Simulations*. Biophysical Journal, 2009. **96**(7): p. 2734-2743.
8. Karlsson, O.P., et al., *Correlation between Bilayer Lipid Dynamics and Activity of the Diglucosyldiacylglycerol Synthase from *Acholeplasma laidlawii* Membranes†*. Biochemistry, 1996. **35**(31): p. 10094-10102.
9. Prenner, E., et al., *Lateral Microheterogeneity of Diphenylhexatriene-Labeled Choline Phospholipids in the Erythrocyte Ghost Membrane as Determined by Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy*. The Journal of Membrane Biology, 2000. **174**(3): p. 237-243.
10. Sabatini, K., et al., *Characterization of Two Oxidatively Modified Phospholipids in Mixed Monolayers with DPPC*. Biophysical Journal, 2006. **90**(12): p. 4488-4499.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados para la preparación de las disoluciones, tales como MgCl_2 , NaCl , Tris, CaCl_2 , CHCl_3 , sacarosa y glucosa, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Las sondas fluorescentes calceína y rodamina-dextrano ($M_w \sim 70000 \text{ g mol}^{-1}$) también fueron adquiridas en Sigma-Aldrich, salvo la sonda FM-1-43 que se adquirió en Molecular Probes (Invitrogen Corp.)

Todas las soluciones acuosas se llevaron a cabo en agua recién filtrada de calidad MilliQ (Millipore®).

3.1.1 Soluciones tamponadas empleadas

Los tampones empleados fueron escogidos en función de los requerimientos de estabilidad de pH ; inicialmente, los experimentos se realizaron con una solución tamponada 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl suplementada con MgCl_2 ; estudios de precipitación y visualizaciones por criomicroscopía electrónica, más tarde, llevaron a la conclusión de que la estabilidad del prótido estaba favorecida en ausencia de tal ión. En este trabajo, la solución tamponada empleada por defecto contendrá la composición anterior, en ausencia de MgCl_2 . Cuando estas condiciones varíen, las modificaciones serán especificadas.

3.1.2 Lípidos

Todos los lípidos utilizados fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids Inc.

En este trabajo, la composición lipídica empleada para la formación de todos los sistemas membranosos contendrá un 80% de 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), un 10% de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (POPG) y un 10 % de 1-hexadecyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ((COOH)PC) (p/v).

Para las membranas con lípidos marcados por fluorescencia, se empleó 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (Rh-PE) a unas concentraciones finales del 1%. En algunos experimentos, se

varió el espesor de la membrana sustituyendo el lípido mayoritario DOPC, por uno de cadena más corta, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), el cual tiene una temperatura de transición de 23°C. Cuando los experimentos se realicen modificando el espesor de la membrana, se especificará el cambio de lípido realizado.

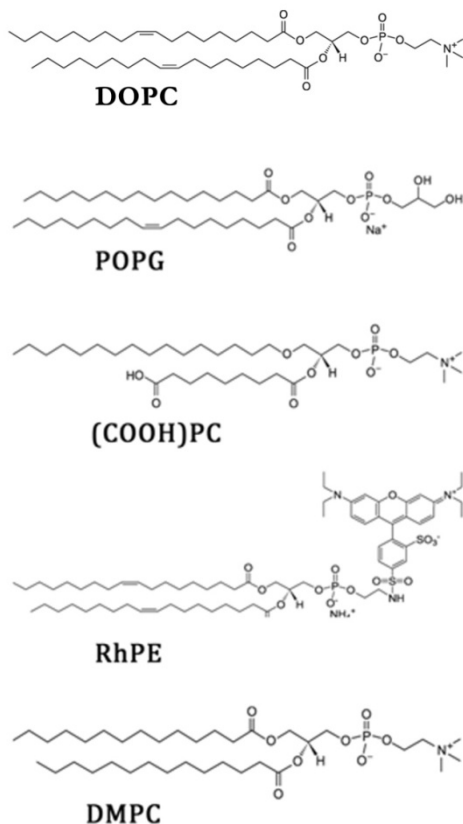


Figura 1. Estructura química de los lípidos empleados. (Imágenes adaptadas de Avanti Polar Lipids Inc.).

3.2 Purificación y marcaje de anticuerpos

Se han utilizado inmunoglobulinas G (IgG) expresadas en conejo frente a p10. Dichos anticuerpos se purificaron a partir de un volumen de 1 mL de suero producido contra la proteína purificada p10 mediante columna de cromatografía de afinidad en sepharosa-G. Una vez purificados, 1 mg de IgGs fueron marcadas fluorescentemente con el kit comercial de Invitrogen AlexaFluor488 (ref. A10235)

Asimismo, se purificó 1 mg de IgGs inespecíficas y se marcó con el mismo kit fluorescente AlexaFluor488 para ser utilizadas como control negativo.

Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, para comprobar su pureza. La solución de proteína pura obtenida se dividió en alícuotas y se congeló rápidamente, manteniéndose a -70°C hasta su uso.

Los experimentos de purificación fueron llevados a cabo por la Dra. Sonia Moreno en el departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) y el marcaje fue realizado por la Dra. Concepción Revilla y el Dr. Javier Domínguez en el departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

3.3 Expresión y purificación de proteínas:

Conector de ϕ -29 (proteína p10)

La expresión y purificación del conector de ϕ -29 se llevó a cabo mediante un protocolo derivado del propuesto por Carrascosa y Salas en 1984. El plásmido pRSET-p10 se utilizó para transformar *E.coli* BL21(DE3) pLysS. Una colonia transformante recién obtenida se usó como inóculo para obtener un cultivo de 400 ml en medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 50 μ g/ml y cloranfenicol a una concentración final de 35 μ g/ml. El cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzarse una DO₆₀₀ de 0,6. En ese momento se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM, e incubando en las mismas condiciones durante 6-8 h adicionales. Las células se sedimentaron por centrifugación a 4°C y 8000 rpm durante 15 minutos en una

centrífuga *Beckmann Avanti J-26 XP*, con un rotor JA 25.50, y se almacenaron congeladas a -20°C hasta su uso.

Para purificar la proteína las células fueron descongeladas, para posteriormente resuspenderlas y sonicarlas en tampón A (50 mM Tris-HCl, pH 7,7, 0,3 M KCl), suplementado con 10mM Mg_2Cl , 5 ug/ml DNAsa, 10 ug/ml RNasa e inhibidores de proteasas. Tras una incubación de 30 minutos en baño de hielo el extracto celular se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos en la misma centrífuga y rotor. El sobrenadante se aplicó a temperatura ambiente a una columna de intercambio iónico DEAE (*Amersham Biosciences*) de 1 ml, previamente equilibrada en tampón A. La proteína no se retiene en esta columna y se obtiene en el eluido inicial lavando con el mismo tampón. Las fracciones correspondientes al pico de proteína se mezclaron y se llevó a cabo la precipitación con sulfato amónico saturado al 43,5%, incubando a 4°C con agitación suave. Se centrifugó la solución de proteína a 11000 rpm durante 30 minutos a 4°C en la misma centrífuga y rotor. El sedimento se resuspendió en 4 ml de tampón B (50mM Tris-HCl, pH 7, 7; 0,1M NaCl) y se dializó frente a unos 500 volúmenes de tampón B.

La solución de proteína se aplicó a un batch de unos 15ml de gel P11 (*Whatman*) previamente equilibrado en unos 6 volúmenes de tampón B y se incubó a 4°C con agitación suave. La proteína queda retenida en el gel y para eluirla se aplicó un gradiente escalonado de NaCl en tampón B, eluyendo p10 en la fracción con 0,8M NaCl [1].

Terminasa de phi29 (gp16):

Se purificó de cultivo de *E. coli* BL21(DE3) transformado con el plásmido pER21-gp16 y con un plásmido que codifica para GroEL, que asiste su plegamiento. Una colonia transformante recién obtenida se usó para preparar el preinóculo de 10ml en LB/ Ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ / cloranfenicol 35 $\mu\text{g/ml}$. La expresión a gran escala se lleva a cabo inoculando este cultivo en 500ml LB/Ap/Cm, incubando a 37°C con agitación hasta $\text{DO}=0.8$ e induciendo la expresión de GroEL con arabinosa 1.17mM (30 minutos a 37°C con agitación) y posteriormente de gp16 con IPTG 1mM durante 2h a 30°C con agitación. Se sedimentaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en buffer TDS1 (Tris 50mM pH7.7/ DTT 1mM/ NaCl 100mM). Se lisaron mediante tratamientos sucesivos con lisozima y DNasaI y se sedimentaron los restos celulares. El extracto (unos 5ml) se mezcló con 45ml de buffer TDS4 (Tris 50mM pH7.7/ DTT 1mM/ NaCl 400mM) y se provocó la precipitación de GroEL mediante tratamiento con 0.16% de PEI durante 1h a 4°C . A continuación se

procedió a la precipitación de gp16 con sulfato amónico al 70%. El precipitado se resuspendió en buffer TBDS2 (Tris 50mM pH7.7/ DTT 1mM/ glicerol 5%/ NaCl 200mM) y se dializó frente a este mismo buffer. La solución de proteína obtenida se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna SP-Sepharose, equilibrada en buffer TBDS2, en la que gp16 queda retenida y se eluye mediante un gradiente lineal del 0 al 50% de buffer TBDS12 (Tris 50mM pH7.7/ DTT 1mM/ glicerol 5%/ NaCl 1200mM). La proteína purificada se dializó frente a TDS4 y se alicuotó y congeló inmediatamente a -80°C hasta su uso.

pRNA de phi29

Se purificó de cultivo de *Bacillus subtilis* transformado con el plásmido pUM102 con resistencia a kanamicina. Una colonia transformante recién obtenida se usó para preparar el preinóculo en 100 ml en LB/ 100 µg/ml kanamicina. Se sedimentaron las células mediante centrifugación a 3000 rpm a 4 °C y se resuspendieron en reactivo TRIZol (Solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina (Invitrogen) durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de proteínas, posteriormente, se añadieron 0,2 mL de cloroformo por cada mL de TRIZol utilizado y se agitó vigorosamente, seguido de una incubación de 3 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se centrifugó la suspensión a 11000 rpm a 4°C durante 15 min para su separación en fases. Se recolectó el sobrenadante incoloro y se le añadió 0,5 mL de Isopropanol 100% por cada mL de TRIZol empleado incubando durante 10 min. Posteriormente, se precipitó el pRNA mediante centrifugación a 11000 rpm a 4°C durante 10 min. Una vez precipitado, se lavó el pRNA con etanol en agua DEPC (agua tratada con Dietil Pirocarbonato) al 70% y tras agitación en vortex se precipitó mediante centrifugación a 11000 rpm a temperatura ambiente durante 15 min hasta obtener un ratio de absorbancias A_{260}/A_{280} ligeramente inferior a 1,6. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 5-10 min y se purificó en gel de agarosa de bajo punto de fusión libre de RNAasas al 2,5% en TBE_{DEPC} (0,5M (NH₄)Ac/1 mM EDTA/ 0,1 % SDS) con bromuro de etidio al 0,01% a 80V durante aproximadamente 60-90 min. Se extrajo la banda correspondiente a 120 pb, se machacó y se eluyó en buffer de elución TBE_{DEPC} a 4°C. Tras la elución, se precipitó la agarosa de la solución con el pRNA en una microfuga a temperatura ambiente durante 10 min y se volvió a lavar el sobrenadante por duplicado, en Etanol al 100% mediante centrifugación a 13000 rpm a 4 °C durante 20 min y en Etanol al 70% a 13000 rpm durante 10 min. Tras los lavados, el pellet fue resuspendido en agua DEPC, alicuotado y congelado a -80°C hasta su uso.

Tanto las expresiones, como las purificaciones de los conectores fueron llevadas a cabo por la Dr. Sonia Moreno, la Dra. Rebeca Bocanegra y el Dr. Roberto Miranda en el departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), mientras que las terminasas y pRNA utilizados en esta tesis doctoral fueron llevadas a cabo por la Dra. Rebeca Bocanegra.

3.4 Elaboración de vesículas (LUVs y GUVs)

Un liposoma puede definirse como una asociación coloidal de lípidos anfipáticos en bicapa, las cuales se organizan espontáneamente en estructuras cerradas en forma de cáscara esférica. Pueden ser preparados a partir de mezclas lipídicas naturales extraídas y purificadas, o a partir de lípidos sintéticos disponibles comercialmente. En la Figura 2, se presenta un esquema relacionando diferentes parámetros que caracterizan las preparaciones liposomales, tales como tamaño, número de lamelas (y su posición relativa), constitución lipídica (lo cual condiciona la carga de la cabeza hidrofílica y el grado de insaturación de las colas alifáticas), estabilidad, modo de preparación y algunas de sus utilidades relevantes.[2]

En cuanto a su clasificación, aparte de la composición química de las moléculas que integran la bicapa lipídica, las preparaciones liposomales suelen diferenciarse en función del tamaño y lameralidad de las vesículas formadas. Según estos criterios, se

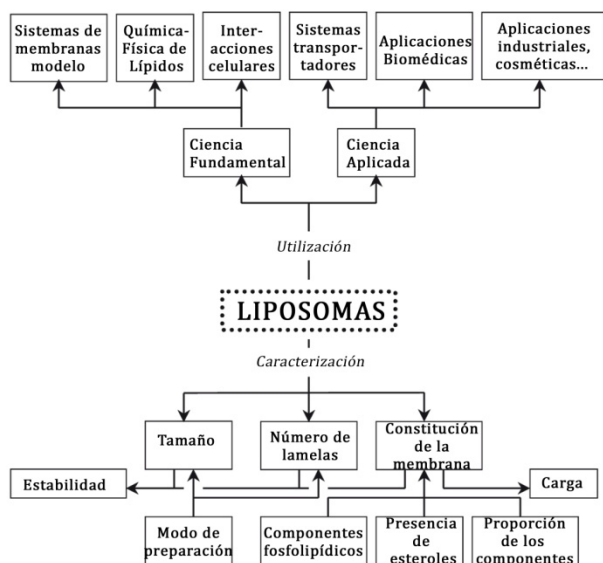


Figura 2. Esquema caracterización de liposomas [2].

pueden encontrar especies compuestas únicamente por una bicapa lipídica (unilamelares), a su vez clasificadas en función de su tamaño; vesículas pequeñas unilamelares (SUV's), rondan tamaños menores a 50 nm, vesículas grandes unilamelares (LUV's), cuyos tamaños oscilan entre 50-1000 nm y vesículas gigantes unilamelares (GUV's), las cuáles comprenden tamaños mayores a 1 μm ; especies compuestas por varias bicapas lipídicas (vesículas oligolamelares -OLV's- y vesículas multilamelares -MLV's-, contienen unas pocas o multitud de lamelas dispuestas concéntricamente) y especies compuestas por multitud vesículas distribuidas no concéntricamente en el interior de una vesícula de mayor tamaño (vesículas multivesiculares -MUV's-).[3]

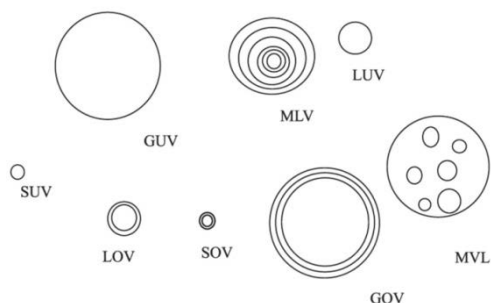


Figura 3. Representación esquemática de los tipos de liposomas en función de su tamaño y número de lamelas [2].

Desde que ha sido posible el desarrollo de modelos matemáticos de superficies bidimensionales en espacios tridimensionales, la aplicación de sistemas experimentales en forma de vesículas gigantes se ha extendido en multitud de disciplinas donde una descripción física de su forma y mecánica aporta una información relevante. Así, hoy día se pueden encontrar aplicaciones de vesículas unilamelares gigantes como células modelo donde realizar una descripción simplificada de los principales procesos celulares o biodispositivos artificiales trabajando como microreactores, en los cuales, varios reactivos, sustratos, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas formadoras de canales y otras sustancias pueden ser reconstituidas o microinyectadas. Pueden utilizarse como modelos simplificados para el estudio de reacciones celulares, tales como el transporte transmembrana, señales de transducción, modelos de división, o el origen de la vida. [4]

Otra característica por la que se ve favorecido el empleo de GUV's, es que pueden observarse directamente por microscopía óptica, lo cual favorece el estudio de parámetros universales e independientes de la escala, tales como coeficientes de permeabilidad o comportamientos mecánicos; y parámetros escalables a tamaños inferiores, tales como eficiencia de encapsulación, área superficial, etc [5].

3.4.1 Preparación de liposomas (LUV's).

La preparación de vesículas grandes, de un modo general, puede ser separada en tres pasos diferentes;

- 1- Preparación de las fases acuosas y preformación de una película lipídica con los componentes deseados.
- 2- Hidratación de la película lipídica con la fase acuosa del primer paso (en este paso ya suelen aparecer MLV's).
- 3- Procesamiento de las MLV's formadas en el segundo paso.

En función de la especie deseada, las técnicas y metodologías empleadas en el segundo y tercer paso serán diferentes. [6]

En el caso de las LUV's empleadas en la presente tesis doctoral, el método utilizado consiste en hacer pasar las MLV's formadas en el segundo paso a través de un filtro de policarbonato de tamaño de poro definido un número impar de veces provocando la ruptura y nueva conformación de las vesículas hacia la producción vesículas unilamelares.[2]

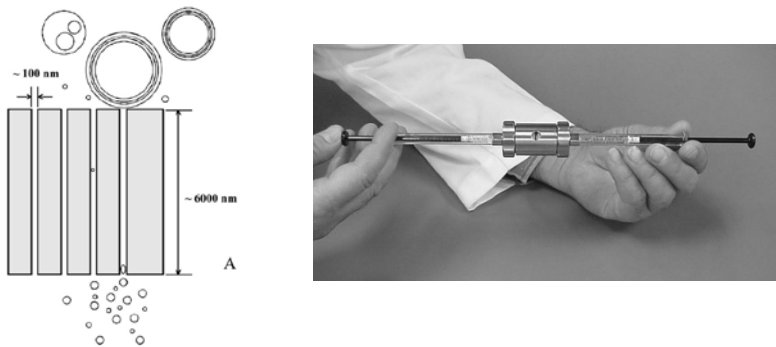


Figura 4. Representación esquemática de la formación de liposomas mediante extrusión y extruder utilizado. (Esquema adaptado de Santos et al. y fotografía obtenidas de AVESTIN Liposofast Inc.)

3.4.2 Preparación de vesículas gigantes unilamelares (GUV's)

Los protocolos de electroformación, generalmente se llevan a cabo mediante la hidratación de películas lipídicas formadas directamente a partir de las correspondientes mezclas lipídicas previamente formuladas en medio orgánico [7].

La inclusión de otros biomateriales en la etapa de preformación de la película en presencia de disolventes orgánicos es aceptable siempre que se trate de caso de proteínas altamente hidrofóbicas susceptibles de mantener su plegamiento en entornos orgánicos. Este es el caso de ciertos polipéptidos y proteínas de bajo peso molecular involucradas en la mecánica alveolar del proceso de respiración animal [8].

En el caso de biomateriales principalmente hidrofílicos, la utilización de medios orgánicos supone una grave incompatibilidad sobre su estabilidad y funcionalidad, ya que debido a su labilidad, tienden a desnaturalizarse, haciendo necesario el empleo de estrategias que eviten al mínimo la utilización de este tipo de disolventes. Para ello,

algunos investigadores, sugieren el empleo de azúcares, tales como la trehalosa, que ayuden a la estabilización al interactuar éstos con los grupos polares expuestos en la superficie de las proteínas [9].

En nuestro caso, para asegurar la óptima inserción del complejo proteico en el interior de las membranas, realizamos la deposición lipídica a partir de membranas preformadas, en las cuales, esta proteína ya se encuentra protegida en un entorno lipídico, facilitando la viabilidad de la misma [10]. Esta deposición se realiza extendiendo una cantidad aproximada de 10 μL a una concentración 10 mg/mL directamente sobre la superficie de una placa de vidrio hasta que permanezcan aparentemente deshidratadas. La superficie de las placas de vidrio que van a formar la cámara de electroformación se caracterizan por estar bañadas con una fina capa de óxido de indio y estaño (ITO), lo cual las convierte en buenos conductores eléctricos [11].

Una vez depositada la muestra, estas placas son montadas en forma de célula mediante un espaciador que deje una distancia de 1mm entre las mismas y que selle la cámara para su posterior llenado. Esta celda se rellena con solución de sacarosa 200mM en agua de calidad MilliQ libre de RNA'sas, formando una célula electroconductiva a modo de condensador.

Una vez elaborada la cámara, se circula durante 3 horas una corriente alterna a través del circuito, con una frecuencia de 8 Hz y una amplitud 1.3 V_{pp} , a la cual, una vez pasado este tiempo, se le disminuirá la frecuencia a 4 Hz durante 5 minutos para favorecer que las vesículas se despeguen de la superficie (para el caso de las vesículas con DMPC en su composición lipídica, la temperatura de electroformación fue realizada a 36°C debido a que la T_m de este lípido es de 24°C. Este es el protocolo convencional para formación de GUVs en medios débilmente conductores a baja fuerza iónica. Las características del campo eléctrico y el protocolo a utilizar están condicionados a las propiedades de conductividad iónica del medio.

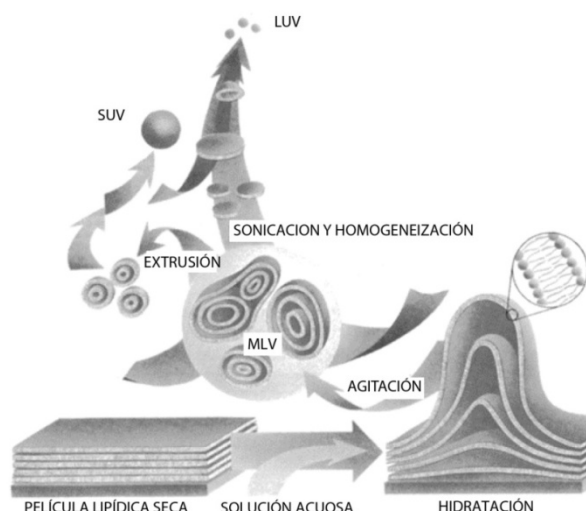


Figura 5. Representación esquemática de las metodologías de preparación de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares (SUV) y vesículas unilamelares grandes (LUV). (Adaptado de Avanti Polar Lipids Inc.)

3.4.3 Ensamblaje de pRNA y gp16 en vesículas gigantes

Para la incorporación del resto de las piezas de la máquina de empaquetamiento se hicieron incubaciones en sucesivos pasos. 100 μL de vesículas de lípidos con p10 recién formadas por electroformación fueron incubadas en una solución tamponada con Tris/Borato/EDTA (TBE) durante 30 min a una temperatura de 36 $^{\circ}\text{C}$, a la que se añadieron 4 μL de pRNA a una concentración de 77 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, para la adicción de la terminasa, a esas alícuotas se les añadieron 20 μL de la terminasa gp16 a una concentración de 0.37 mg/mL .

Para la observación de las muestras en el microscopio, la gota de observación se formó a partir de 75 μL de glucosa en buffer TMS a la que se añadieron 25 μL de la muestra respectiva para cada caso generada tras incubación.

Para los ensayos de actividad, 20 μL de ATP fueron añadidos en las muestras con la terminasa ensamblada.

Durante la realización de estos experimentos todo el material fue lavado con NaOH u acetona para evitar la presencia de RNAsas y todas las disoluciones fueron preparadas en H₂O-DEPC

3.5 Ensayos bioquímicos:

3.5.1 Separación en gradientes discontinuos de densidad

Una manera de detectar la incorporación de proteínas en liposomas es mediante la centrifugación zonal o centrifugación en gradientes de densidad, [12] la cual permite la separación entre liposomas con proteína incorporada (proteoliposomas), liposomas sin proteína incorporada y proteínas libres no incorporadas que permanecen en la disolución remanente.

Este tipo de centrifugación fue propuesta por Brakke en 1951 [13] y en esencia, se basa en la capacidad de separar partículas diferentes en cuanto a tamaño y forma en función de su flotabilidad y velocidades de difusión características cuando son sometidas a una fuerza centrífuga.

La fuerza centrífuga aparente experimentada por una partícula de volumen V y densidad d cuando es centrifugada a una velocidad angular de ω radianes/segundo (un círculo es 2π radianes, por lo que $\omega = 2\pi \times (\text{RPM}) \div 60$) es $V \cdot d \cdot r \omega^2$ donde r es la distancia de la partícula desde el centro de rotación. Como la partícula desplaza algo del medio del gradiente de densidad, los principios de Arquímedes indican que habrá un empuje hacia arriba de la partícula igual al peso del líquido desplazado, resultando $V \cdot \rho \cdot r \omega^2$, donde ρ es la densidad del medio. De este modo, la fuerza resultante neta C es dada como:

$$C = (d - \rho)r\omega^2 \quad (1)$$

Si asumimos que nuestra partícula es esférica, con un radio R y que se mueve con una velocidad v , por la ley de Stokes, la fuerza friccional opuesta al movimiento será

$$F = 6\pi R\eta v \quad (2)$$

Donde η será la viscosidad del medio.

Una partícula del tamaño de fragmentos celulares sedimentando en un medio líquido, puede asumirse que alcanza su velocidad final instantáneamente, por lo que podemos prescindir de su aceleración, por lo que las fuerzas internas y externas se igualarán

$$F = C; \quad 6\pi R\eta v = V(d - \rho)r\omega^2 \quad (3)$$

Y la velocidad de sedimentación v será

$$v = \frac{V}{6\pi R} \cdot \frac{d-\rho}{\eta} \cdot r\omega^2 \quad (4)$$

Si el medio de centrifugación es definido (ec. 4), vemos que la velocidad de sedimentación es proporcional a la aceleración centrífuga $r\omega^2$, pudiendo reescribirlo como

$$v = s r\omega^2 \quad (5)$$

Donde

$$s = \frac{V}{6\pi R} \cdot \frac{d-\rho}{\eta} \quad (6)$$

Si asumimos que el tamaño y forma de las partículas no varía según se van produciendo los cambios de medio, podemos deducir que si un medio particular tiene una densidad de ρ_1 y una viscosidad de η_1 , y un segundo medio tiene una densidad de ρ_2 y una viscosidad de η_2 , los valores de s en el segundo medio serán

$$s_2 = \frac{V}{6\pi R} \cdot \frac{d - \rho_2}{\eta_2}$$

O lo que es lo mismo,

$$s_2 = s_1 \cdot \frac{d-\rho_2}{d-\rho_1} \cdot \frac{\eta_1}{\eta_2} \quad (7)$$

Si combinamos la ecuación de la velocidad de sedimentación con la ecuación del coeficiente de sedimentación en un segundo medio, observamos que:

$$v = s_1 \cdot \frac{d-\rho_2}{d-\rho_1} \cdot \frac{\eta_1}{\eta_2} \cdot r\omega^2 \quad (8)$$

Para partículas biológicas, los valores de s suelen ser muy pequeños, por lo que, por convenio, se llegó al acuerdo de multiplicarlo por 10^{13} . En estos casos, el coeficiente de sedimentación es escrito en las ecuaciones con letra capital S que da cuenta del coeficiente de sedimentación en unidades estandarizadas (Svedberg).

$$v = S_1 \times 10^{13} \cdot \frac{d-\rho_2}{d-\rho_1} \cdot \frac{\eta_1}{\eta_2} \cdot r\omega^2 \quad (9)$$

Donde S_1 es el coeficiente de sedimentación en Svedbergs.

Si inspeccionamos la ecuación 8, podemos observar, que la velocidad de sedimentación está gobernada principalmente por cuatro factores: 1) El coeficiente de sedimentación de la partícula; 2) La densidad de la partícula; 3) La densidad y viscosidad del medio de centrifugación; 4) La fuerza centrífuga [14, 15].

De manera, que el resultado de la reconstitución de proteínas en liposomas proporcionará dos tipos de partículas, liposomas con proteína incorporada y proteínas libres; las cuales tendrán unas velocidades de sedimentación lo suficientemente diferentes para poder ser recolectadas en alguno de los diferentes medios del gradiente.

La incorporación del complejo en LUVs mediante el proceso de co-extrusión se detectó separando las fracciones de liposomas interaccionando con el complejo proteico (p10) de los conectores libres mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (0-20%) [16].

Los proteoliposomas, son sometidos a un gradiente discontinuo de densidad en el que la muestra co-extruida es primero depositada en una capa de sacarosa al 20%. Sucesiva a esa capa, se fueron añadiendo a 4°C con cuidado diferentes capas de sacarosa de 15, 10, 8, 7, 6 y 5% de sacarosa (p/v) las cuales fueron centrifugadas posteriormente a 54.000 rpm (~100.000 g) a 4 °C durante 3 horas en un rotor Beckman TLA 100.3 en una ultracentrífuga Beckman Coulter OPTIMA MAX. Una vez finalizada la centrifugación, las diferentes fracciones fueron recolectadas para su posterior caracterización, tanto lipídica (mediante fluorimetría de los lípidos, los cuales fueron marcados con Liss Rhod PE) como proteica (mediante SDS-PAGE y Wester-Blot).

3.5.2 Caracterización lipídica por fluorimetría

Los liposomas empleados para la separación en el gradiente de densidad fueron marcados fluorescentemente con Liss Rhod PE (Avanti Polar Lipids).

La medida de fluorescencia de los lípidos contenidos en cada una de las fracciones nos permite tener un control de las bandas en las que se depositan los liposomas con y sin proteína incorporada.

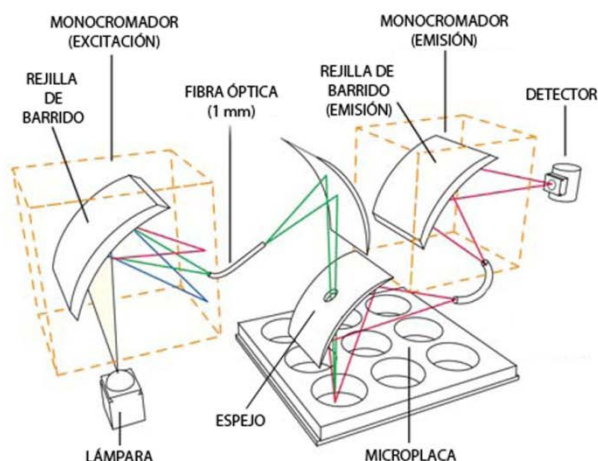


Figura 6. Esquema de un lector de placas estándar. Una longitud de onda de excitación es seleccionada mediante un monocromador a través de un espejo conducida hacia la muestra. La fluorescencia, que se produce en todas las direcciones, es dirigida hacia la óptica del detector por el mismo espejo. Normalmente, la microplaca se mueve a la posición de cada pocillo en la trayectoria de observación a través de una pletina robotizada de exploración X-Y.[17] (Imagen adaptada de la Ref. 16)

En una placa de 96 pocillos (nunc maxisorp 96), se añadieron 100 μL de cada alícuota recolectada en el gradiente y 7 pocillos más con las mismas características que los colchones con los que se formó el gradiente.

Las longitudes de onda de excitación y emisión empleadas fueron 520 nm y 575nm respectivamente. Las medidas fueron tomadas en un lector de fluorescencia de placa Fluostar Galaxy (BMG Labtechnologies) (Ver Fig. 6).

3.5.3 Caracterización proteica mediante Western-Blot

El concepto de separación del método se basa en la migración de proteínas (cargadas) a través de un polímero de poliacrilamida en presencia de un campo eléctrico en función de su carga, y la posterior transferencia de las mismas, una vez separadas, a una membrana (nitrocelulosa, PVDF, etc.) donde son accesibles para su posterior revelado.

Se prepararon geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12% de poliacrilamida y se dejaron polimerizar durante toda la noche. Una vez polimerizados, se montaron en las cubetas de electroforesis y se desnaturalizaron las muestras en 5 mL de glicerol, 2g de SDS, 3,125 mL de Tris-HCl 1M pH=6,8, 625 μ L de H₂O.

Posteriormente, se cargaron las muestras en los geles, se añadió un marcador de peso molecular y un carril control (únicamente proteína), una vez finalizada la carga, se llenaron las cubetas con una solución tamponada LAEMMLI (28.8g glicina, 6g TRIS, 10 mL SDS 10% y H₂O hasta 1 L) y se conectaron a una corriente de 40 mA. Los marcadores de peso molecular utilizados eran Precision Plus Protein Standards DUAL COLOR de BioRAD. Una vez separadas las muestras, se realizó una transferencia semi seca en Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell de BioRAD durante 1h a 200mA en membrana de nitrocelulosa Protran Nitrocellulose Transfer Membrane adquirida en Whatman. Cuando finalizó la transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa, se bloquearon las membranas en Blotto (5% leche desnatada en polvo diluida en PBS) a temperatura ambiente durante 1h. Posteriormente se hicieron 3 lavados en PBS y se incubaron con suero policlonal de conejo anti p10 a un ratio 1:5000 en PBS durante 1 hora.

Finalizada la incubación con los anticuerpos, se volvieron a lavar las membranas con PBS durante 3 ciclos y se incubaron con otro anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa), diluido a un ratio 1:10000 en PBS durante otra hora a temperatura ambiente y se volvieron a hacer 3 lavados más para retirar los anticuerpos libres.

La detección se realizó con un reactivo comercial ECL Western Blotting Detection Reagents de Amersham. Se lavó la membrana con PBS y se reveló con cloronaftol (3,5 mL de cloronaftol a 3mg/mL, 12,5 mL de PBS y 13 μ L de H₂O₂). La reacción se detuvo con H₂O. Las películas se revelaron en papel radiográfico X-Ray Medical Film de Konica Minolta [18-20].

3.6 Técnicas microscópicas

Una de las grandes ventajas a la hora de trabajar con liposomas se debe a la posibilidad de poder variar su tamaño en función de nuestras necesidades. Gracias a esta posibilidad de escalado, en este trabajo se ha podido implementar el uso de diferentes técnicas microscópicas.

Estas técnicas nos permiten tanto la observación del aspecto y forma, como la cuantificación de observables, tales como dimensiones, diámetros, longitudes y otras variables morfológicas.

A continuación se detallarán las metodologías empleadas durante los tipos de microscopías utilizadas en la presente tesis doctoral.

3.6.1 Microscopía Óptica

Microscopio: La gran parte de los análisis indirectos de inserción del complejo en las membranas lipídicas se realizaron mediante este tipo de microscopía, la cual posibilitó la determinación de la reología de la membrana a través de la observación de su respuesta mecánica frente a estímulos externos.

Las técnicas de visualización fueron llevadas a cabo por contraste de fases tanto en campo claro como en fluorescencia. Se emplearon dos microscopios diferentes en función del objetivo del estudio.

Para los ensayos de fluctuaciones de membrana en campo claro se utilizó un microscopio óptico invertido NIKON Eclipse Ti con la particularidad de que tiene asociada una cámara CMOS de filmación de alta velocidad PHOTRON FASTCAM SA-3 permitiendo adquirir hasta un máximo de 200000 imágenes en un segundo.

En los experimentos en fluorescencia, se optó por un microscopio NIKON Eclipse TE2000 dotado de una pletina automática con capacidad de movimiento en el plano “z” y manipulación con pipetas. Este microscopio cuenta con una cámara CCD de alta sensibilidad y resolución (1Mb) NIKON.

Muestra: Para la visualización de las vesículas gigantes mediante campo claro, la disolución interna con la que se rellenó la cámara de electroformación contenía sacarosa; una vez finalizado el proceso de formación, el contenido de la cámara fue diluido en una solución de sacarosa con una concentración ligeramente superior a la concentración de sacarosa contenida en el medio interno. Este procedimiento nos asegura tres condiciones imprescindibles para los análisis.

- 1- La diferencia entre los índices de refracción entre los dos azúcares nos permite diferenciar la interfase entre los dos medios, lo cual hace visible la membrana.
- 2- Debido a la ligera diferencia de concentración entre los dos medios es generado un ligero exceso de área que nos permite poder analizar las fluctuaciones de la membrana.
- 3- La diferencia de densidad entre los azúcares ($\rho_{\text{sac}} > \rho_{\text{gluc}}$) provoca que las vesículas tiendan a sedimentarse mientras están siendo visualizadas.

Para evitar anomalías por efectos de evaporación y corrientes convectivas del medio, las muestras fueron colocadas entre dos cubreobjetos distanciados entre sí por un separador de teflón con un grosor de 5mm.

Para la visualización en fluorescencia, en función del tipo de análisis a realizar, los medios empleados fueron los mismos que los utilizados para la visualización en campo claro, pero suplementados con diferentes fluoróforos en función del tipo de ensayo.

3.6.1.1 Estudios de fluctuaciones de membrana en GUVs.

Para la obtención de los espectros de fluctuaciones de las membranas, a partir del análisis de contornos, se tomaron películas de vesículas presentando un exceso de área lo suficientemente grande para poder ser vistas por microscopía óptica. Posteriormente, se detectó la posición de la membrana con una buena precisión y se reconstruyó el perímetro en su totalidad. La detección, está basada en el contraste óptico producido en la zona de la membrana de las vesículas separando medios de diferente índice de refracción sacarosa_{in}/glucosa_{exterior}. Así, la membrana aparece como una zona oscura acompañada de un halo blanco debido a difracción en la zona exterior) [21, 22].

Para cada imagen, los puntos del contorno (\tilde{x}_i, \tilde{y}_i) son detectados y almacenados utilizando un algoritmo previamente codificado sobre la base de la propuesta realizada por Pecreaux et al. [22]. Una vez detectados todos los puntos del perfil, se calcula la longitud de los contornos L , donde \tilde{x}_i e \tilde{y}_i son las coordenadas cartesianas con i variando desde 1 hasta N puntos del contorno detectados para cada imagen instantánea. Por tanto, la distancia curvilínea ds_i se calcula como

$$ds_i = \sqrt{(\tilde{x}_{i+1} - \tilde{x}_i)^2 + (\tilde{y}_{i+1} - \tilde{y}_i)^2} \quad (10)$$

Cuando el contorno está cerrado, se cumple que

$$ds_0 = ds_N = \sqrt{(\tilde{x}_1 - \tilde{x}_N)^2 + (\tilde{y}_1 - \tilde{y}_N)^2} \quad (11)$$

Por lo que la longitud L se obtiene de

$$L = \sum_{i=1}^N ds_i$$

Una vez se calcula L , es comparada con su promedio en el tiempo $\langle L \rangle$, de modo que cualquier que perímetro que se desvíe un 10% es desechado.

Una vez calculados los contornos, se realiza una transformación de las coordenadas cartesianas $(\tilde{x}_i, \tilde{y}_i)$ a coordenadas polares (r_i, θ_i) donde el centro de la vesícula $(\tilde{x}_c, \tilde{y}_c)$ se define como el promedio de todos los puntos i en el contorno ponderado por la suma de las distancias entre los puntos $i-1$ y i y entre los puntos i y $i+1$:

$$\tilde{x}_c = \frac{1}{2L} \sum_{i=1}^N \tilde{x}_i (ds_{i-1} + ds_i) \quad (12)$$

Para \tilde{y}_c , se emplea una relación similar. Una vez convertidos a cartesianos polares, el radio, puede definirse como:

$$r = \frac{1}{4\pi} \sum_{i=1}^N (r_i + r_{i+1}) \times (\theta_{i+1} + \theta_{i-1}) \quad (13)$$

Una vez calculados los radios, el siguiente paso consiste en la obtención de los espectros de fluctuaciones $\langle \zeta_q \zeta_q \rangle$. En una membrana plana, las desviaciones de la posición de equilibrio son pequeñas respecto su tamaño. Las fluctuaciones en un punto de la membrana, se definen como una pequeña variación de la altura de dicho punto, respecto a un plano de referencia, y pueden definirse como

$$\zeta = \zeta_0 + \delta\zeta \quad (14)$$

Donde $\delta\zeta$ es la variación diferencial de la altura. En la mecánica estadística, este tipo de cálculos se realiza mediante un desarrollo en serie (Armónicos Esféricos, Series de Fourier, etc.) de la variable que caracteriza la desviación respecto a la magnitud de equilibrio. Las características técnicas del microscopio utilizado en nuestros experimentos no permiten visualizar el objeto de estudio en una geometría tridimensional, como consecuencia, las imágenes obtenidas se toman en el plano ecuatorial de la muestra, lo cual nos constriñe a realizar un desarrollo en serie acorde con esta característica. En nuestro análisis, se ha optado por la detección de las

fluctuaciones en el plano perpendicular de la membrana, una metodología de elección por su fácil tratamiento matemático a través del desarrollo del radio r en series de Fourier para así obtener las amplitudes de cada modo de fluctuación:

$$r(\theta) = R(1 + \sum_{n=1}^{\infty} a_n \cos(n\theta) + b_n \sin(n\theta)) \quad (15)$$

donde R es el radio equivalente de la vesícula, el cual es igual al radio de una esfera del mismo volumen, por lo que la condición de volumen constante es necesaria durante el tiempo del experimento. Con este desarrollo en serie, obtenemos del contorno esférico de la vesícula en el plano ecuatorial, donde θ es el ángulo de cambio de radio en coordenadas polares, de modo que al descomponer la forma de la vesícula fluctuante para cada instante de tiempo, en los diferentes modos de deformación, caracterizados por un modo de Fourier n .

Los modos n representados en el esquema están relacionado con el radio y el vector de onda q como $n=qR$. A partir de la amplitud de cada modo $c_n = \sqrt{a_n^2 + b_n^2}$ calculamos las fluctuaciones de la posición de la membrana en el tiempo. Considerando que el sistema es ergódico, podemos calcular el espectro de fluctuaciones experimental mediante el promedio temporal de la amplitud de las fluctuaciones c_n para cada modo como

$$\langle \zeta_q \zeta_q \rangle = \frac{\pi(R)^3}{2} (\langle |c_n|^2 \rangle - \langle |c_n|^2 \rangle) \quad (16)$$

En la que $\langle \rangle$ se define como el promedio temporal.

La ecuación (16) es la expresión mediante la cual se calculan la amplitud de las fluctuaciones de la membrana a través de su observación experimental por microscopia óptica, una metodología denominada Espectroscopia de Parpadeo (Flickering Spectroscopy).

El tratamiento cuantitativo de los datos experimentales obtenidos, requiere un modelo de ajuste para el espectro (Véase apartado 2.2.1 de Introducción)

3.6.1.2 Experimentos de aspiración con micropipetas.

El montaje experimental se construyó en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000 equipado con un objetivo 60X y una cámara CCD. Estos experimentos fueron llevados a cabo en una habitación termostatzada a 18°C para evitar la evaporación de la muestra. Se utilizaron micropipetas de borosilicato cuyas puntas fueron pulidas en una microforja. Para evitar la adhesión del lípido a la micropipeta, las puntas fueron tratadas con albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración del 1%. Las micropipetas fueron montadas en un micromanipulador piezoeléctrico tridimensional para controlar la posición de la punta de la pipeta. Las diferencias de presión fueron impuestas mediante la diferencia de altura de dos vasos comunicantes equipados con un micrómetro.

Esta técnica, desarrollada por Evans et al. [23, 24], permite la cuantificación del exceso de área superficial contenido en una vesícula cuya membrana está fluctuando. Para ello, una vesícula fluctuante es aspirada con una micropipeta mediante una diferencia de presión. Al aplicar la diferencia de presión, la membrana se pone bajo tensión y se introduce dentro de la micropipeta.

La diferencia de presión ΔP y la tensión de membrana generada σ están relacionadas mediante la ley de Laplace [23, 24]:

$$\sigma = \frac{R_{PIP}}{2(1-R_{PIP}/R_{VES})} \Delta P \quad (17)$$

donde R_{pip} es el radio de la pipeta y R_{ves} el radio de la vesícula. El exceso de área contenido en la membrana (α) se define como $\alpha = (A - A_p)/A$, donde A es el área de la membrana fluctuante y A_p es el área proyectada en el mismo plano de la membrana. En función de la aspiración, el exceso de área va decreciendo a medida que la diferencia de presión va aumentando provocando el aumento de superficie (lengua) en el interior de la micropipeta (L). Como estado de referencia se escogen las condiciones en las cuales hay que aplicar una presión de succión mínima para aspirar la vesícula en el interior de la micropipeta ($\Delta P, L_0$).

Por lo que la variación del exceso de área se va comparando con ese estado de referencia mediante [23, 24]:

$$\Delta\alpha = \alpha_0 - \alpha = \frac{(R_{pip}/R_{ves})^2 - (R_{pip}/R_{ves})^3}{2R_{pip}} \Delta L \quad (18)$$

El exceso de área, puede ser expresado usando el desplazamiento local de la membrana en su mismo plano [25]:

$$\Delta\alpha = \left\langle \frac{(\nabla_{\perp} u)^2}{2} \right\rangle = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_0^{q_{max}} \frac{1}{2} q_{\perp}^2 \langle u(q_{\perp})^2 \rangle 2\pi q_{\perp} dq_{\perp} \quad (19)$$

En la integral anterior, en función del rango de q en el que converja la integral podemos encontrar dos regímenes para los casos de membranas pasivas, uno dominado por la curvatura $\langle u(q_{\perp})^2 \rangle = K_B T / \kappa q_{\perp}^4$, y un régimen dominado por la tensión $\langle u(q_{\perp})^2 \rangle = K_B T / \kappa q_{\perp}^2$. De modo, que para una membrana pasiva, la relación lineal entre el logaritmo de la tensión y el incremento de la presión ejercida permite nos permite obtener el módulo de curvatura en el régimen dominado por curvatura.

$$\Delta\alpha = \alpha_0 - \alpha = \frac{K_B T}{8\pi\kappa} \ln \frac{\sigma}{\sigma_0} \quad (20)$$

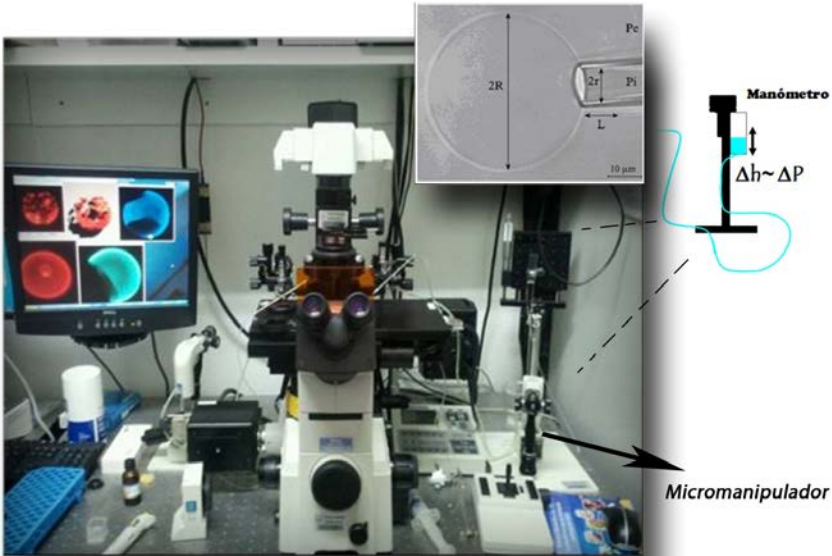


Figura 7. Fotografía del microscopio óptico de fluorescencia utilizado en esta técnica modificado con un esquema del dispositivo.

3.6.1.3 Estudios de pérdida selectiva por tamaño en GUVs (Microscopía óptica de fluorescencia).

Se prepararon vesículas gigantes unilamelares mediante el protocolo descrito de electroformación en presencia de dos fluoróforos de diferente tamaño (la disolución de llenado fue suplementada con rodamina-dextrano (1 mM) y calceína (1 mM) (Sigma-Aldrich)).

Previamente a la visualización microscópica, la suspensión de vesículas fue centrifugada en un tubo Eppendorf a 45,000 rpm durante 1h (se favoreció la sedimentación aumentando la concentración). Una vez concentradas, un volumen 10 μ L fue extraído del fondo del Eppendorf y disuelto en una gota de glucosa 208 mM libre de fluoróforos.

Para la visualización microscópica, las vesículas fueron escogidas por seguimiento en campo claro, y posteriormente se realizaba un seguimiento mediante capturas instantáneas por fluorescencia en un intervalo de tiempo de 60 segundos (el tiempo de exposición requerido por la primera instantánea constante).

Los experimentos fueron realizados en un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TE2000.

El análisis de intensidades se realizó con el software libre ImageJ. Para evitar aberraciones provocadas por efectos de blanqueamiento de fluorescencia en las medidas, se realizó el siguiente análisis de intensidades relativizando la intensidad de fluorescencia atrapada en el interior de las vesículas respecto el medio externo [26].

$$\delta(t) = \frac{A_{in}I_{in}(t) - A_{ext}I_{ext}(t)}{A_{in} + A_{ext}} \quad (21)$$

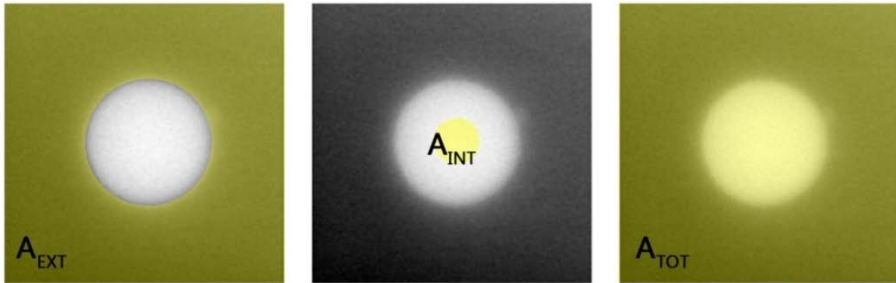


Figura 8. Ejemplo de análisis de área para una vesícula en un determinado instante t_0 . (Las áreas resaltadas en amarillo corresponden a las variables utilizadas en la Ec. 21)

Donde A corresponde a sus correspondientes áreas e I_X corresponde a los valores de intensidad medios obtenidos para cada área analizada.

Una vez realizado el análisis, todos los resultados fueron normalizados y comparados en cada uno de los casos.

3.6.1.4 Caracterización de vesículas gigantes con p10 mediante inmunofluorescencia.

La caracterización estructural mediante el reconocimiento a través de anticuerpos es una herramienta muy extendida dada la alta especificidad en la detección, la fuerte interacción antígeno-anticuerpo y la gran variedad de posibilidades en el diseño experimental. La mayoría de los experimentos utilizan sistemas de inmunodetección por fluorescencia indirectos, o lo que es lo mismo, el fluorocromo que se visualiza no está presente en el anticuerpo primario (el que reconoce el antígeno de interés), sino que existe un anticuerpo secundario que contiene el fluorocromo y a su vez reconoce al anticuerpo primario. La utilización en la práctica de anticuerpos secundarios, es bastante beneficiosa ya que la señal a detectar es amplificada. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, la inmunofluorescencia directa, en la cual el fluorocromo está conjugado directamente a los anticuerpos primarios, es preferible, ya que se pueden evitar problemas tales como uniones inespecíficas del secundario y señales de fondo o efectos de ruido.

En cuanto al tipo de anticuerpo, en función de la especificidad regional del reconocimiento, se pueden escoger anticuerpos monoclonales, los cuales reconocerán únicamente determinadas regiones en el antígeno, o anticuerpos policlonales, los cuales reconocen múltiples regiones dentro de un antígeno [27].

Se tomaron vesículas gigantes unilamelares recién electroformadas las cuales fueron incubadas durante toda la noche en presencia de los anticuerpos (concentración final 1mM) a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas en exceso de solución salina suplementada con glucosa 308 mM y centrifugadas a 10000 rpm durante 2 minutos (Hettich Zentrifugen Mikro 120) con el fin de reducir el exceso de fluorescencia producido por los anticuerpos libres y la proteína libre inmunodetectada en la solución externa de las vesículas.

La visualización se llevó a cabo en un microscopio óptico de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000 mediante un filtro de fluorescencia FITC (EX465-495 nm).

3.6.2 Microscopía confocal

La microscopía confocal, es una de las herramientas de microscopía óptica más utilizada en el ámbito de la investigación biológica. Esto es debido, a que en el contexto de las microscopías ópticas convencionales, es la que presenta mejor resolución (la luz procedente de otros planos está limitada), tanto para estudios de reconstrucción tridimensional por tomografías en el plano Z, como para estudios de co-localización con dos sondas fluorescentes diferentes.

Su funcionamiento, se caracteriza por la utilización de una o varias fuentes de excitación (Láser). La luz láser pasa a través de un filtro y un diafragma que expande el rayo de luz, los haces de luz obtenidos de la expansión se reflejan después en un espejo dicróico, el cual hace que estos haces se focalicen en el mismo plano de la muestra. La radiación fluorescente emitida atraviesa después este mismo espejo dicróico y llega al segundo diafragma situado justo frente al detector, el cual sólo permite llegar al detector la luz perteneciente a ese plano focal. Existe un tipo particular de microscopio confocal, el de barrido, el cual posee un sistema de espejos que mueve la luz procedente de la fuente de excitación en el plano X-Y de la muestra, haciendo posible el escaneado o barrido de la fluorescencia de una región determinada de la muestra en el mismo plano focal. La emisión de luz de cada una de estas secciones barridas ópticamente es después recogida en un detector (fotomultiplicador) y enviada a un ordenador para su procesamiento. Si el barrido se repite después en planos sucesivos a lo largo del eje Z, se puede reconstruir una imagen tridimensional del espécimen. Además, esta técnica permite detectar simultáneamente distintos fluoróforos (co-localización de distintas sondas fluorescentes) cuando se usan simultáneamente distintas longitudes de onda de excitación (múltiples fuentes láser) [28].

Se utilizó un microscopio confocal Leica SP2 con un DMIRE 2 etapas, disponible en el CAI de Citometría de Flujo de la UCM. Dos diferentes láseres de excitación se utilizaron, Ar/ArKr (488 nm) y HeNe (543nm), para la emisión en el canal verde (calceína) y en el canal rojo (rodamina). Las imágenes fueron adquiridas y tratadas usando un software Leica Confocal Software (LCS).

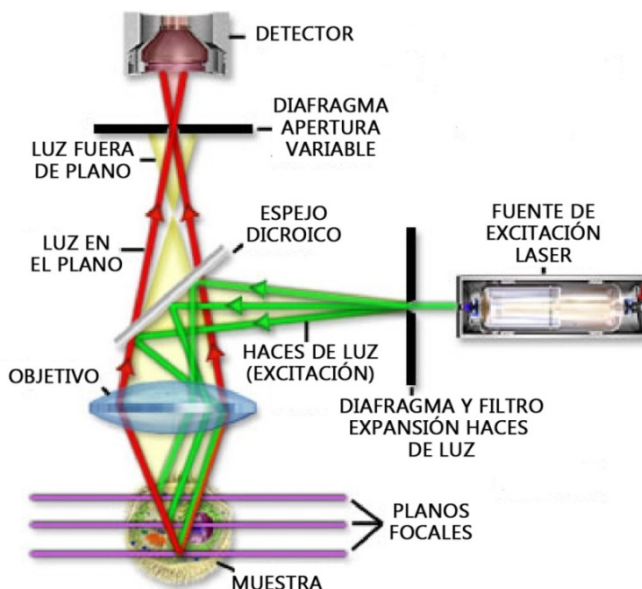


Fig. 9 Representación esquemática de la configuración de un microscopio confocal (simple). (Imagen adaptada de <http://www.microscopyu.com>).

3.6.2.1 Estudios de pérdida selectiva por tamaño en LUVs

LUVs y proteo-LUVs fueron preparados por co-extrusión (16 mg / ml de lípido total) en la solución tamponada (0,1 mg / ml de proteína, 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 200 mM NaCl) suplementada con rodamina-dextrano (0,5 mM) y calceína (0,5 mM), las membranas de polycarbonato utilizadas en el momento de la extrusión tenían un tamaño de poro de 1mm . Para obtener contraste óptico entre el lumen interior fluorescente y el medio exterior de la suspensión, 5 μ L de la suspensión de liposomas fue diluida en 15 μ L de solución tampón (50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl) libre de fluoróforos y posteriormente se almacenó a 4 °C durante la noche.

3.6.3 Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM)

La microscopía de fuerzas atómicas (AFM) se incluye dentro del grupo de las microscopías de proximidad. Como herramienta, puede resultar de gran interés ya que ofrece caracterizaciones topográficas de sustratos a escala atómica, tanto en medio líquido como en seco [29, 30].

Una de sus grandes ventajas reside en la posibilidad de visualizar muestras húmedas “in situ”, sin necesidad de tinciones ni fijaciones previas y en solución, lo cual, a la hora de estudiar materiales biológicos puede resultar muy ventajoso, al hacerse posible el estudio de cambios morfológicos en condiciones funcionales a lo largo del tiempo.

El fundamento de la técnica se basa en la medida de las fuerzas de interacción entre una punta metálica muy aguda localizada en el extremo de una micropalanca flexible y la superficie de la muestra a lo largo de una serie de rastreos horizontales. La transducción de esas fuerzas de interacción está resuelta a través de un fotodiodo que capta los desplazamientos de la micropalanca recibidos desde un haz laser localizado en la superficie de la misma (el haz laser en función de los movimientos de deflexión efectuados por la micropalanca varía la reflexión sobre el fotoreceptor)[31]. Para mejorar la resolución de la superficie de la muestra, ésta debe ser depositada sobre un soporte sólido que presente cierta afinidad por la misma y atómicamente plano (normalmente grafito, sílica o mica).

La micropalanca está situada en la superficie de un posicionador piezoeléctrico regulable el cual proporcionará los movimientos tanto en el plano (X, Y), como en el plano Z.

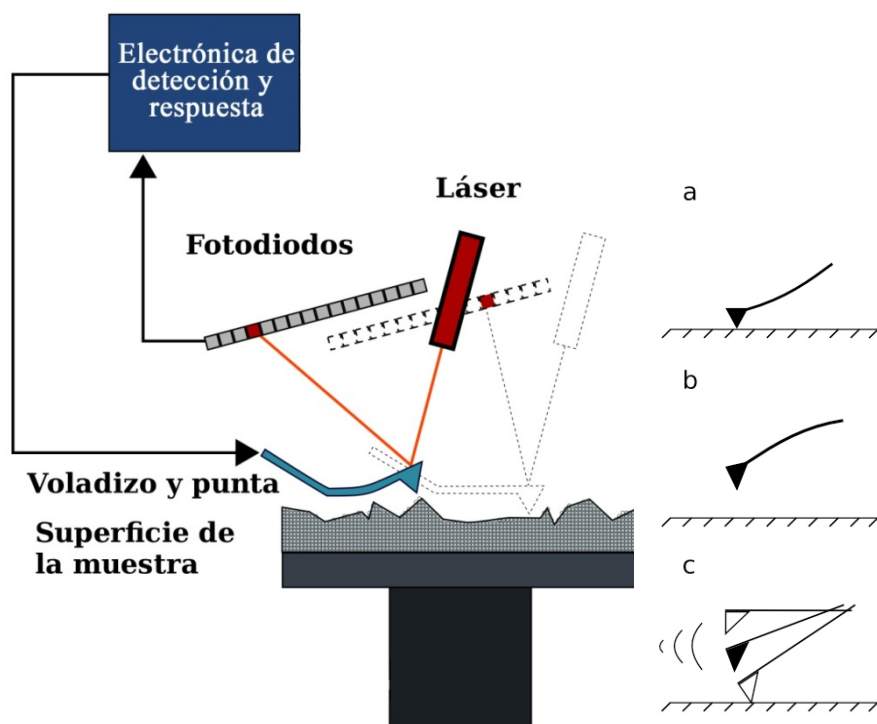


Figura 10. (Izq.) Representación esquemática de la configuración de un microscopio de fuerzas atómicas. (Dcha.) Modos de operación: a) Modo de contacto; b) Jump mode; c) Tapping. (Imágenes adaptadas de <http://es.wikipedia.org/>).

Aparte de imágenes estructurales, este tipo de microscopía puede dar información de características tales como fuerzas moleculares, propiedades elásticas, etc. a través de la espectroscopia de fuerza, también denominada curva de fuerza.

En la figura 11, se observa una representación esquemática de una curva de fuerza típica en la que se observan los cambios de fuerza en función de la distancia del piezoeléctrico a la muestra. Cuando la punta está lejos de la muestra (1) no se observa desviación en la micropalanca, pero a medida que se va acercando a la muestra, en el momento en el que entra en contacto con la muestra (2) la fuerza va aumentando (3) hasta el momento en que vuelve a ser retraída de la muestra y la fuerza vuelve a disminuir (4) hasta que vuelve a desaparecer el contacto con la muestra y la fuerza vuelve a ser nula (5).

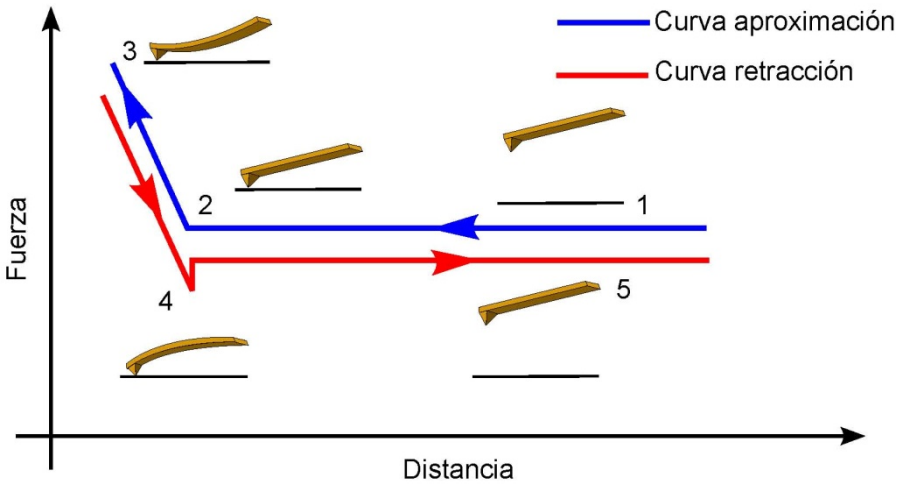


Figura 11. Representación esquemática de una curva de fuerza típica con ilustración de los cambios experimentados por la micropalanca en función de la posición del piezoeléctrico. (Imagen adaptada de Roduit, C. "AFM figures" 2010, www.freesbi.ch, Creative Commons Attribution).

El modo de operación puede ser efectuado de diferentes formas (contacto, *jump mode*, *tapping*) en función de características tales como densidad, viscosidad y la variación de las mismas medidas en tiempo real. Mientras que el modo de contacto es altamente disruptivo con muestras biológicas blandas, es el modo de "tapping" el considerado de elección con las mismas.

Durante las medidas en modo de contacto, la punta al realizar el barrido, se mantiene en contacto físico con la muestra, lo cual lo convierte en un modo invasivo con la muestra pero que a su vez ofrece como ventaja una gran resolución de las imágenes obtenidas.

Un empleo menos invasivo es llevado a cabo con los otros dos tipos de modos, ya que durante el "*jump mode*", la micropalanca se excita cerca de su frecuencia de resonancia provocando que vibre cerca de la superficie de la muestra, lo cual minimiza efectos de rozamiento provocados por la punta.

En el otro modo, "*tapping*", la punta está en contacto intermitente con la muestra, lo cual aumenta la resolución de las imágenes con respecto al modo anterior y evita la invasividad de la muestra. La limitación que encuentra este modo es que no puede realizarse en medios líquidos [32].

En la presente tesis doctoral, las imágenes de microscopía de fuerzas atómicas fueron tomadas mediante "*jump mode*" con puntas de nitruro de silicio (Olympus) a una fuerza

constante de 0,05 N/m. en un microscopio Nanotec Electrónica S.L., situado en el grupo de Biofuncionalización de Superficies del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP). El piezoeléctrico se calibró utilizando una rejilla de calibración de silicio (NT-MDT Moscú, Rusia). El sistema empleado se caracteriza por poseer un láser de longitud de onda de 635 nm y 3,5 mW de potencia y un sistema de adquisición de datos que se realiza de manera digital mediante un procesador digital de la señal. La adquisición de imágenes puede realizarse mediante modos dinámicos y de contacto, así como la visualización óptica simultánea. La adquisición, representación y tratamiento de las imágenes fue realizada con un software libre WSxM desarrollado por la compañía Nanotec Electrónica S.L. [33].

3.6.3.1 Preparación de bicapas planas

Un volumen de 40 μL (0,1mg/mL) de liposomas fueron incubados durante 2,5 horas sobre una superficie de mica recién exfoliada en presencia de la solución tamponada 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 suplementada con 10 mM CaCl_2 (lo cual favorece la fusión de las vesículas lipídicas en la superficie de mica formándose bicapas lipídicas planas) [34].

Una vez finalizó la incubación, las muestras fueron lavadas con la misma solución tamponada y visualizadas por AFM.

3.6.4 Criomicroscopía electrónica de transmisión

Mediante esta técnica se puede visualizar y obtener información acerca de la estructura, morfología y tamaño. Su fundamento reside en hacer incidir un haz de electrones sobre una muestra previamente vitrificada. Cuando los electrones atraviesan la muestra sufren interacciones elásticas e inelásticas muy fuertes. Las inelásticas son principalmente consecuencia de la interacción entre los electrones y la corteza del átomo, provocando pérdidas de energía, ruido en imágenes y daños estructurales en los especímenes. Las interacciones elásticas se producen por la interacción entre los electrones y el campo electrostático de los núcleos atómicos, siendo responsables, por otra parte, del contraste de la imagen. Para evitar los daños causados por irradiación y vacío, como para aumentar el contraste de la imagen, la preparación de estas muestra se realiza mediante congelaciones ultrarrápidas, de esta forma, el agua permanece en una conformación vítrea (se evita la aparición de cristales).

Para la microscopía electrónica se utilizaron rejillas Quantifoil de Cu/Rh de 300 huecos R 2/2 cubiertas de una fina película de carbón sobre las que se aplicaron 3ul de muestra (proteoliposomas o liposomas sin conectores) a una concentración de 2mg/ml. Tras una incubación de 5 minutos las rejillas fueron bloteadas 2s y congeladas rápidamente en etano líquido utilizando una unidad de vitrificación Leica EM CPC. Las rejillas vitrificadas fueron transferidas a un microscopio electrónico FEI Tecnai G2 F20 operado a 200kV en condiciones criogénicas utilizando un criobrazo Gatan. Las imágenes se registraron bajo condiciones de mínima dosis. La criomicroscopía electrónica se hizo con la ayuda de Rocío Arranz.

3.7 Técnicas de dispersión de Luz

La dispersión de luz es una técnica que durante las tres últimas décadas se ha convertido en una de las técnicas más importantes en ciencia de coloides, esto es debido a que los láseres son fuentes de luz de bajo coste, coherentes y de alta potencia. La intensidad alcanzable es diez órdenes de magnitud mayor que en los métodos de dispersión de neutrones, lo que permite obtener estadísticas excelentes

El principio básico de los métodos de dispersión, en general, consiste en que cuando la radiación (luz láser o neutrones) interacciona con una muestra se produce dispersión o difracción debido a correlaciones espacio-temporales presentes en ésta. La magnitud más importante en esta clase de experimentos es el denominado vector de dispersión q que se define como:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda/n} \sin \frac{\theta}{2} \quad (22)$$

Donde λ representa la longitud de onda de la radiación utilizada y θ el ángulo de dispersión. Dicho vector de dispersión tiene unidades de inversa de longitud y como tal, indica la resolución espacial del experimento. A bajos valores de q puede observarse el tamaño y forma total de ovillos poliméricos y coloides. En cambio, a valores de q más altos puede resolverse la estructura interna de partículas y cadenas poliméricas. Según la propiedad específica que se desee estudiar (escala de longitud) se elige el método de dispersión apropiado (intervalo de q). Por ejemplo la dispersión de luz, tanto estática (SLS) como dinámica (DLS), es adecuado para estudiar el tamaño y forma total de partículas grandes.

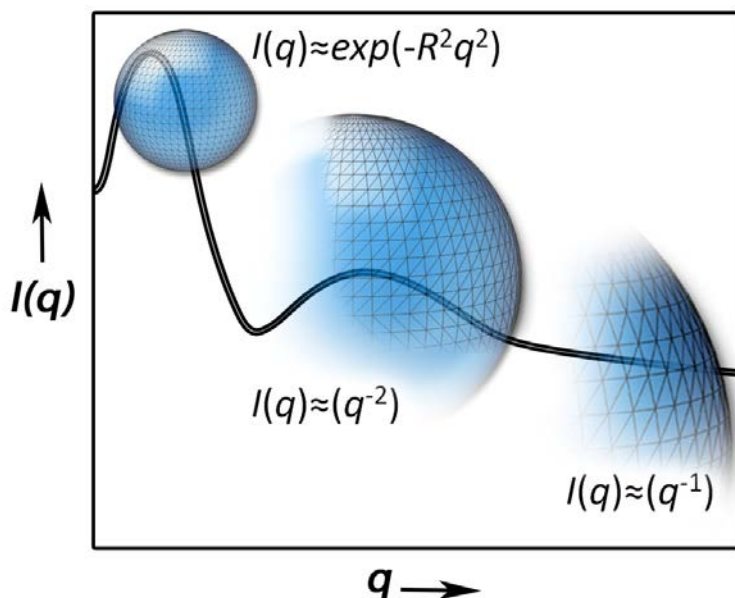


Figura 12. Curva de dispersión elástica de una disolución de partículas coloidales. A valores de q bajos se puede monitorizar el tamaño total de las partículas, mientras que a valores de q altos se puede resolver su estructura interna.

Los experimentos de dispersión de neutrones a bajo ángulo (SANS) dan acceso a un intervalo de q tres órdenes de magnitud menor que los experimentos de dispersión de luz y junto con la espectroscopia spin-eco de neutrones (NSE) son adecuados para estudiar estructuras y movimientos locales (internos)[35-37] . SLS y SANS son métodos de dispersión elástica, también denominados estáticos, porque monitorizan la media temporal de la intensidad de dispersión (ver Fig. 12).

En cambio, DLS y NSE son métodos inelásticos, o mejor dicho *quasi*-elásticos, porque estudian la transferencia de energía entre la muestra y la radiación utilizada. La distribución inicial de longitudes de onda (del láser o de la fuente de neutrones) se ensancha debido a la transferencia de energía con la muestra (ensanchamiento Doppler) de manera que el factor de estructura dinámico $S(q, \omega)$ puede ser monitorizado. En concreto, tanto DLS como NSE miden directamente la transformada de Fourier de $S(q, \omega)$, ésto es $S(q, t)$ (ver Fig. 13).

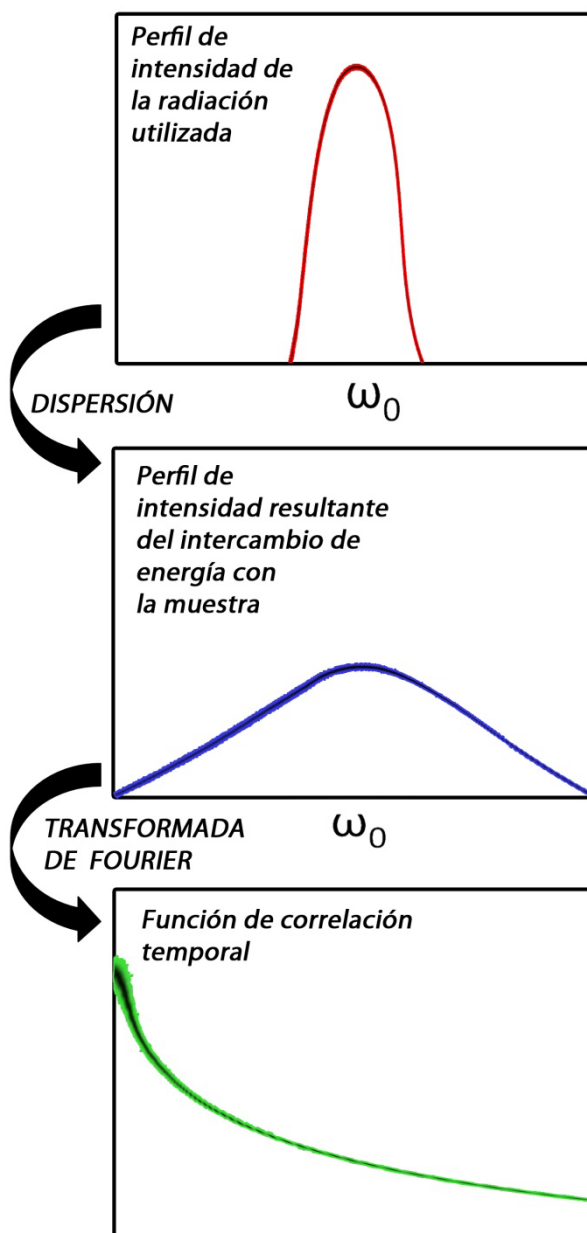


Figura 13. Esquema de los procesos y relaciones importantes en los experimentos de dispersión *quasi-elástica*. La radiación empleada presenta un perfil característico que se ensancha debido al intercambio de energía con la muestra.

3.7.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Se empleó un dispositivo comercial ALV Laser Vertriebsgesellschaft (Langen, Alemania), el cual emplea la línea verde (514 nm) de un láser de Ar⁺ con potencia de salida de hasta 600 mW. La intensidad primaria del láser se monitoriza mediante un divisor de haz y un fotodiodo. La celda de termostatación donde se coloca la muestra está situada sobre un goniómetro motorizado de gran precisión ($\pm 0.001^\circ$), lo que permite que el detector fotomultiplicador se mueva en el intervalo de ángulos de dispersión desde 5° hasta 150° (ver Fig. 14).

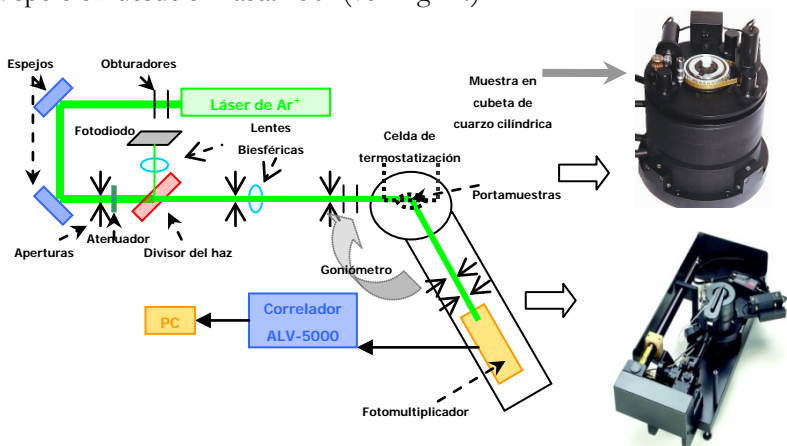


Figura 14. Esquema del dispositivo para la realización de experimentos de dispersión de luz, tanto estática como dinámica. La línea verde representa el recorrido del rayo láser. Las figuras insertadas a la derecha representan la celda de termostatación (arriba) y el goniómetro sobre el que se monta el dispositivo (abajo).

La intensidad medida en un experimento de este tipo es proporcional al cuadrado del campo eléctrico dispersado, $\langle I \rangle \sim \langle E^2 \rangle$. I es una cantidad fluctuante y como tal puede analizarse haciendo uso del formalismo de las funciones de correlación [38, 39]. La *función de autocorrelación de campo eléctrico normalizada* $g^1(\tau)$ contiene información acerca de la dinámica del sistema que dispersa y responde a la expresión:

$$g^1(\tau) = \frac{\langle E_s^*(t) E_s(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle} \quad (23)$$

En un experimento de tipo heterodino, dicha función puede ser medida directamente, pero en la práctica es mucho más sencillo llevar a cabo un experimento homodino y

determinar la *función de autocorrelación de intensidad normalizada* $g^2(\tau)$ que responde a la expresión:

$$g^2(\tau) = \frac{\langle E_s^*(t)E_s(t)E_s^*(t+\tau)E_s(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (24)$$

Ambas funciones están relacionadas mediante la relación de Siegert:

$$g^2(\tau) = \beta \left[1 + |g^1(\tau)|^2 \right] \quad (25)$$

donde β representa la línea base. En el caso de una muestra monodispersa ideal, $g^1(\tau)$ queda perfectamente definida mediante una exponencial simple:

$$g^1(\tau) = \exp(-\Gamma \tau) \quad (26)$$

con $\Gamma = D^T q^2$, donde D^T representa el coeficiente de difusión traslacional y q el vector de dispersión. Pero, las muestras suelen ser polidispersas y el decaimiento de la función de autocorrelación queda mejor descrito por una suma promediada de exponenciales:

$$g^1(\tau) = \int_0^{+\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma \quad (27)$$

donde $G(\Gamma)$ es la función de distribución de velocidades de relajación.

El análisis de dicha distribución de velocidades de relajación puede realizarse con diferentes métodos. Los más utilizados son el método de los cumulantes [40-42] y el análisis mediante transformada inversa de Laplace usando el programa denominado CONTIN [43, 44] o bien el denominado REPES [45].

A partir del valor medio $\overline{\Gamma}$ se puede obtener el coeficiente de difusión traslacional D^T :

$$\overline{\Gamma} = D^T q^2 \quad (28)$$

Conociendo D^T se puede determinar el radio hidrodinámico haciendo uso de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D^T = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (29)$$

La ecuación equivalente para el coeficiente de difusión rotacional es de la forma:

$$\Theta_{\perp} = \frac{kT}{8\pi\eta R_s^3} \quad (30)$$

La dependencia cúbica con el radio hace que el coeficiente de difusión rotacional sea mucho más sensible que el traslacional a cambios estructurales.

En el caso de partículas que interaccionan débilmente y que se encuentran en baja concentración, la dependencia del coeficiente de difusión traslacional con la concentración puede describirse por:

$$D_{\text{exp}}^T = D_0^T (1 + k_D [C]) \quad (31)$$

siendo k_D el coeficiente de difusión del virial que incluye efectos termodinámicos y de fricción. Para interacciones fuertes dicha linealidad deja de cumplirse.

Preparación de las muestras:

Se formaron liposomas por el método de extrusión a una concentración final de 0.05 mg/mL con tamaños de poro 50, 100, 200, 400 y 800 nm en una cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones indebidas por material externo (polvo). Los radios medidos se llevaron a cabo entre 45° y 120° en intervalos de 5°.

3.7.2 Espectroscopia spin-eco de neutrones (NSE)

Estos experimentos fueron realizados en el instrumento IN15 en el Instituto Laue-Langevin (ILL), en Grenoble, Francia [46]. Este instrumento proporciona los tiempos de Fourier más altos actualmente disponibles en todo el mundo. Las muestras fueron colocadas en células del cuarzo (1mm de espesor, Hellma). El instrumento fue equipado con un soporte termostático para estas células y todas las mediciones se realizaron a una temperatura de 25.0 ± 0.1 . Los tiempos de Fourier utilizados iban hasta los 207ns y fueron explorados diferentes valores de q en un rango de 0.184 nm^{-1} hasta 1.201 nm^{-1} . Para lograr esto, tuvieron que realizarse las mediciones en longitudes de onda de $\lambda = 12 \text{ \AA}$ y 15 \AA . La distribución de longitud de onda en ambos casos tuvo una anchura a media altura de $\Delta\lambda/\lambda = 0.15$.

La técnica de eco de espín de neutrones es una técnica de dispersión inelástica única que mide los cambios experimentados por la velocidad de los neutrones cuando interactúan con la materia mediante el uso de su $\frac{1}{2}$ giro como un temporizador

La espectroscopia spin-eco de neutrones utiliza el teorema de Lamor del espín del neutrón en un campo magnético como un temporizador. Contabiliza el número de precesiones hechas por el neutrón antes y después de atravesar la muestra, el cambio producido en el interior de la muestra es una medida de su velocidad, energía.

En la Figura 15 se muestra un esquema ilustrativo con las diferentes etapas por la que pasa el haz en el momento de su medición. En un primer paso, un haz policromático de neutrones incide sobre un selector de velocidades que limita el ancho de banda entrante $\Delta\lambda / \lambda$ convirtiéndolo un haz monocromático. Este haz, posteriormente es polarizado filtrándose los neutrones con giro incorrecto e iniciándose la precesión de Larmor mediante un volteo $\pi/2$, que rota los giros perpendiculares al campo magnético principal continuando hacia la muestra. Una vez atraviesen la muestra, en el caso de muestras elásticas, el giro de los neutrones no es modificado, mientras que si la muestra es inelástica, el giro de los neutrones sufre algún tipo de alteración. Una vez atravesada, un volteo π transforma el ángulo de precesión α en $-\alpha$ hasta alcanzar un segundo volteo $\pi/2$.

Las integrales de campo utilizadas en las dos zonas de precesión definidas entre el volteo π son iguales, por lo que la diferencia en el ángulo de precesión existente entre estas dos zonas proporciona la información acerca de la elasticidad en el proceso de dispersión.

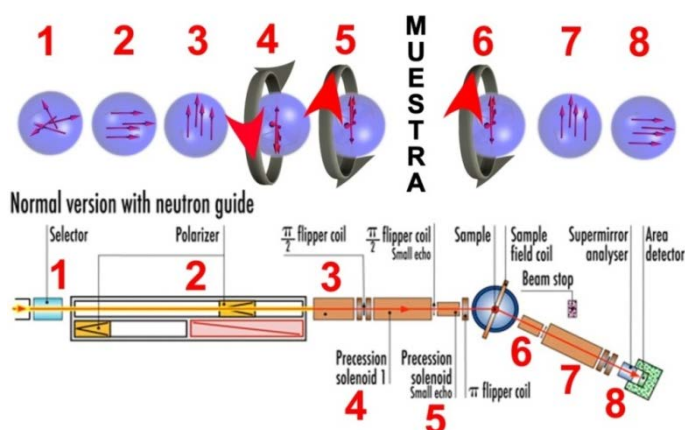


Figura 15. Esquema ilustrativo de los cambios de precesión sufridos por los neutrones durante una medida en un espectroscopio spin-eco de neutrones (IN15). (Imagen adaptada de *Morley, G, ILL*)

Se formaron liposomas por el método de extrusión a una concentración final de 0.5 mg/mL con tamaños de poro 100 nm de radio a diferentes ratios lípido/proteína (1:0/1:200000/1:37000) en agua deuterada en una cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones indebidas por material externo (polvo). Los radios medidos se llevaron a cabo entre 45° y 120° en intervalos de 5°.

Debido a que el hidrógeno produce una dispersión diez veces más alta a la del deuterio, la medición en técnicas de dispersión de neutrones debe realizarse en medios deuterados para acceder más fácilmente al factor dinámico de estructura de los átomos de hidrógeno que conforman las muestras, es por ello que el disolvente en estos experimentos fue agua deuterada.

3.7.2.1 Función de dispersión intermedia: Procedimiento de análisis

En vista a la teoría descrita en el capítulo de introducción, para el análisis de los datos obtenidos mediante espectroscopia de dispersión espín-eco es necesario calcular la amplitud relativa de los movimientos de la membrana a través de una ecuación que describa eficazmente los decaimientos de relajación y que sea capaz de diferenciar los movimientos causados por la traslación, de los movimientos realizados por la fluctuación de la bicapa. En vesículas típicas, el componente debido a la traslación suele dominar sobre el modo de fluctuación en un intervalo de vectores de onda $qR < 20$, por lo que son regímenes donde este componente no puede ser descuidado. Además, en sistemas rígidos, ($\kappa > 0 \text{ } \kappa_B T$), la influencia en el decaimiento debido al término de la traslación está acentuado, por lo que el intervalo de q 's también se ve aumentado. Un ejemplo de ello puede observarse en el caso de una vesícula típica con $R \approx 100\text{nm}$ y $\kappa \approx 20\kappa_B T$, donde la componente de traslación debe estar considerada a vectores de onda de $q \gg 0.5\text{nm}^{-1}$ ($qR \gg 50$), por lo que es relevante en todo el rango de vectores de onda accesibles por esta técnica. Considerando los trabajos de Zilman y Granek [47, 48], los perfiles normalizados en NSE podrían describirse mediante la siguiente ecuación:

$$S(q, t) \approx \exp(-D_T q^2 t) \{A + (1 - A) \exp[-(\Gamma_{ZG} t)^{2/3}]\} \quad (32)$$

Como los movimientos debidos a la traslación dominan sobre las fluctuaciones de curvatura, el factor de estructura es difícil de analizar cuando el régimen $qR < 10$ es explorado [49-51]. En este régimen, se suele utilizar la función bimodal “aparente” aproximada [52-54]:

$$S(q, t) \approx A \exp(-D_T q^2 t) + (1 - A) \exp[-(\Gamma t)^{2/3}] \quad (33)$$

La cual es válida si $\Gamma \gg D_T q^2$, una condición que usualmente se cumple en el rango de NSE.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ibáñez, C., et al., *Overproduction and purification of the connector protein of Bacillus subtilis phage ø29*. Nucleic Acids Research, 1984. **12**(5): p. 2351-2365.
2. Santos, N.C., et al., *Lipossomas: a bala mágica acertou?* Química Nova, 2002. **25**: p. 1181-1185.
3. Walde, P., et al., *Giant Vesicles: Preparations and Applications*. ChemBioChem, 2010. **11**(7): p. 848-865.
4. Mouritsen, P.O.G., *Life –as a matter of fat*, ed. D.D.M.D.A.C.E.M.P.S.J.T.H.D. Zeh. 2005: Springer Berlin Heidelberg New York.
5. Walde, P.L.L.a.P., *Giant Vesicles*. 2000: JOHN WILEY & SONS, LTD.
6. Woodle, M.C. and D. Papahadjopoulos, *Liposome preparation and size characterization*. Methods Enzymol, 1989. **171**: p. 193-217.
7. Angelova, M.I. and D.S. Dimitrov, *Liposome electroformation*. Faraday Discussions of the Chemical Society, 1986. **81**(0): p. 303-311.
8. Parra, E., et al., *A combined action of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C modulates permeability and dynamics of phospholipid membranes*. Biochemical Journal, 2011. **438**(3): p. 555-564.
9. Crowe, L.M., D.S. Reid, and J.H. Crowe, *Is trehalose special for preserving dry biomaterials?* Biophysical Journal, 1996. **71**(4): p. 2087-2093.
10. Folgering, J.H.A., et al., *Lipid-Mediated Light Activation of a Mechanosensitive Channel of Large Conductance*. Langmuir, 2004. **20**(17): p. 6985-6987.
11. Méléard, P., L.A. Bagatolli, and T. Pott, *Chapter 9 - Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: From Lipid Mixtures to Native Membranes Under Physiological Conditions*, in *Methods in Enzymology*, D. Nejat, Editor. 2009, Academic Press. p. 161-176.
12. Rigaud, J.L., M.T. Paternostre, and A. Bluzat, *Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1988. **27**(8): p. 2677-88.
13. Brakke, M.K., *Density Gradient Centrifugation: A New Separation Technique*1. Journal of the American Chemical Society, 1951. **73**(4): p. 1847-1848.
14. *Chapter 1 Introduction to zonal centrifugation*, in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, T.S. Work and E. Work, Editors. 1978, Elsevier. p. 8-45.

15. *Chapter 2 Theoretical aspects of centrifugal separations*, in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, T.S. Work and E. Work, Editors. 1978, Elsevier. p. 46-69.
16. Rigaud, J.L. and D. Levy, *Reconstitution of membrane proteins into liposomes*. *Methods Enzymol*, 2003. **372**: p. 65-86.
17. *Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy*, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. Lakowicz, Editor. 2006, Springer US. p. 27-61.
18. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979. **76**(9): p. 4350-4354.
19. Burnette, W.N., "Western Blotting": *Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. *Analytical Biochemistry*, 1981. **112**(2): p. 195-203.
20. Mathews, S., E. Plaisance, and T. Kim, *Imaging Systems for Westerns: Chemiluminescence vs. Infrared Detection*, in *Protein Blotting and Detection*, B.T. Kurien and R.H. Scofield, Editors. 2009, Humana Press. p. 499-513.
21. Döbereiner, H.G., et al., *Mapping vesicle shapes into the phase diagram: A comparison of experiment and theory*. *Physical Review E*, 1997. **55**(4): p. 4458-4474.
22. Pécrciaux, J., et al., *Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles*. *The European Physical Journal E*, 2004. **13**(3): p. 277-290.
23. Evans, E. and D. Needham, *Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1987. **91**(16): p. 4219-4228.
24. Evans, E. and W. Rawicz, *Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes*. *Phys Rev Lett*, 1990. **64**(17): p. 2094-2097.
25. Helfrich, W. and R.M. Servuss, *Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes*. *Il Nuovo Cimento D*, 1984. **3**(1): p. 137-151.
26. Tamba, Y., et al., *Single GUV Method Reveals Interaction of Tea Catechin (-)-Epigallocatechin Gallate with Lipid Membranes*. *Biophysical Journal*, 2007. **92**(9): p. 3178-3194.
27. Pringle, J.R., et al., *Chapter 19 Fluorescence Microscopy Methods for Yeast*, in *Methods in Cell Biology*, M.T. Alan, Editor. 1989, Academic Press. p. 357-435.
28. Booth, M.J., et al., *Adaptive aberration correction in a confocal microscope*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(9): p. 5788-5792.

29. Engel, A. and D.J. Muller, *Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(9): p. 715-8.
30. Binnig, G., et al., *Atomic Resolution with Atomic Force Microscope*. EPL (Europhysics Letters), 1987. **3**(12): p. 1281.
31. Meyer, G. and N.M. Amer, *Novel optical approach to atomic force microscopy*. Applied Physics Letters, 1988. **53**(12): p. 1045-1047.
32. Horber, B.P.J.J.K.H., ed. *Atomic Force Microscopy in Cell Biology*. ed. L.W.P. Matsudaira. Vol. 68. 2002, Academic Press An imprint of Elsevier Science.
33. Horcas, I., et al., *WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology*. Review of Scientific Instruments, 2007. **78**(1): p. 013705-8.
34. Jass, J., T. Tjärnhage, and G. Puu, *From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study*. Biophysical Journal, 2000. **79**(6): p. 3153-3163.
35. Hellweg, T. and D. Langevin, *Bending elasticity of the surfactant monolayer in droplet microemulsions: Determination by a combination of dynamic light scattering and neutron spin-echo spectroscopy*. Physical Review E, 1998. **57**(6): p. 6825-6834.
36. Hellweg, T. and D. Langevin, *The dynamics in dodecane/C10E5/water microemulsions determined by time resolved scattering techniques*. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications, 1999. **264**(3-4): p. 370-387.
37. Hellweg, T., et al., *Shape fluctuations of microemulsion droplets: a neutron spin-echo study*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **183-185**(0): p. 159-169.
38. Schmitz, K.S., *An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules*. 1990: Academic Press.
39. Brown, W., *Light Scattering: Principles and Development*. 1996: Oxford University Press, Incorporated.
40. Koppel, D.E., *Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants*. The Journal of Chemical Physics, 1972. **57**(11): p. 4814-4820.
41. Barger, C.B., *Analysis of intensity correlation spectra of mixtures of polystyrene latex spheres: A comparison of direct least squares fitting with the method of cumulants*. The Journal of Chemical Physics, 1974. **60**(6): p. 2516-2519.
42. Barger, C.B., *Measurement of a continuous distribution of spherical particles by intensity correlation spectroscopy: Analysis by cumulants*. The Journal of Chemical Physics, 1974. **61**(5): p. 2134-2138.

43. Provencher, S.W., *A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations*. Computer Physics Communications, 1982. **27**(3): p. 213-227.
44. Provencher, S.W., *CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations*. Computer Physics Communications, 1982. **27**(3): p. 229-242.
45. Jakeš, J., *Regularized Positive Exponential Sum (REPES) Program - A Way of Inverting Laplace Transform Data Obtained by Dynamic Light Scattering*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 1995. **60**(11): p. 1781-1797.
46. Schleger, P., et al., *The sub-neV resolution NSE spectrometer IN15 at the Institute Laue-Langevin*. Physica B: Condensed Matter, 1999. **266**(1-2): p. 49-55.
47. Zilman, A.G. and R. Granek, *Membrane dynamics and structure factor*. Chemical Physics, 2002. **284**(1-2): p. 195-204.
48. Granek, R., *From Semi-Flexible Polymers to Membranes: Anomalous Diffusion and Reptation*. J. Phys. II France, 1997. **7**(12): p. 1761-1788.
49. Messenger, R., P. Bassereau, and G. Porte, *Dynamics of the undulation mode in swollen lamellar phases*. J. Phys. France, 1990. **51**(12): p. 1329-1340.
50. Komura, S., et al., *Dynamical fluctuation of the mesoscopic structure in ternary C₁₂E₅-water-n-octane amphiphilic system*. Physical Review E, 2001. **63**(4): p. 041402.
51. Farago, B., et al., *Shape and size fluctuations of microemulsion droplets: The role of cosurfactant*. Physical Review Letters, 1990. **65**(26): p. 3348-3351.
52. Kučerka, N., et al., *Models to analyze small-angle neutron scattering from unilamellar lipid vesicles*. Physical Review E, 2004. **69**(5): p. 051903.
53. Arriaga, L.R., et al., *Stiffening Effect of Cholesterol on Disordered Lipid Phases: A Combined Neutron Spin Echo + Dynamic Light Scattering Analysis of the Bending Elasticity of Large Unilamellar Vesicles*. Biophysical Journal, 2009. **96**(9): p. 3629-3637.
54. Brocca, P., et al., *Shape Fluctuations of Large Unilamellar Lipid Vesicles Observed by Laser Light Scattering: Influence of the Small-Scale Structure*. Langmuir, 2004. **20**(6): p. 2141-2148.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

Tal como se ha planteado en los objetivos de esta tesis doctoral, se ha propuesto una ruta sintética para llevar a cabo la inserción ortogonal de la proteína p10 en el interior de bicapas lipídicas. Una vez alcanzada la ruta bioquímica adecuada para este objetivo, se ha procedido a la caracterización del sistema híbrido y a la determinación de su capacidad funcional mediante diferentes métodos químicos y físicos. Este capítulo comenzará con las estrategias de integración bioquímica, así como la caracterización del híbrido integrado en condiciones de orientación ortogonal susceptibles de propiciar el estado funcional y la posible puesta en servicio del dispositivo activo de translocación de DNA. Posteriormente se describirá la caracterización física que ha posibilitado la determinación cuantitativa de las propiedades mecánicas y de permeabilidad de las membranas híbridas con el conector en condiciones funcionales. Los presentes resultados han sido discutidos en base a las herramientas teóricas y experimentales descritas en el capítulo anterior.

La estructura en la que se expondrán los resultados puede ser resumida según los siguientes puntos:

- i.* Pruebas de interacción/asociación bicapa lipídica-p10
- ii.* Pruebas de integración ortogonal
- iii.* Análisis dinámico del sistema en relación a su viscoelasticidad.
- iv.* Adaptación de una nueva membrana a las nuevas condiciones del motor phi29 y caracterización .
- v.* Caracterización dinámica de la actividad del motor phi29 en membranas.

4.1 Interacción lípido-proteína

Al objeto de diseñar una interacción óptima entre la proteína y los lípidos que constituyen la bicapa membranaria se ha propuesto una formulación estructuralmente estable y que incluye reactividad con la proteína basada en la presencia de lípidos oxidados. Estos lípidos presentan un grupo funcional en forma de ácido carboxílico en la posición distal de una de sus colas hidrofóbicas. Dichos lípidos serían susceptibles de reaccionar con aminoácidos básicos de la superficie expuesta de la proteína, fundamentalmente a nivel del cinturón ecuatorial, la cual constituye la localización aproximada en la que quedarán los grupos funcionales lipídicos una vez producida la integración del conector en la bicapa. Para determinar la formulación óptima, se realizaron separaciones desde proteoliposomas elaborados a partir de *membranas adaptadas a la superficie del conector* (membrana ideal propuesta) y membranas compuestas de un lípido simple (DOPC), en gradientes discontinuos de sacarosa (obsérvese esquema fig. 1 (b)). Las diferentes fracciones obtenidas fueron recogidas y sometidas a la identificación tanto lipídica (análisis fluorimétrico de los lípidos) como proteica (Western-Blot). (Ver Fig. 1 (“a” y “c” respectivamente). Los resultados de ambas caracterizaciones pueden observarse en la Fig. 1.

La caracterización lipídica mediante análisis fluorimétrico se realizó mediante marcaje lipídico indirecto utilizando la sonda rodamina-PE). En la Figura 1.a, puede observarse, cómo los lípidos están localizados en las fracciones de menor porcentaje de sacarosa; estas fracciones corresponden a los intervalos de concentración más elevados dentro de la columna de densidad (zona grisácea resaltada en la Fig 1.b), las cuales corresponden a las zonas donde cabría esperar encontrar liposomas en una separación.

En cuanto a la caracterización de la proteína mediante Western-Blot (Fig. 1.c). Se mostraron diferencias significativas en cuanto a la localización del complejo proteico para cada caso. Para el caso de los proteoliposomas formados a partir de membranas adaptadas en presencia de *p10*, los resultados del Western-Blot indicaron una banda con presencia de la misma en el carril correspondiente a una concentración del 6%, lo cual sugiere la existencia de interacción entre *p10* y membrana. Para el caso de los proteoliposomas elaborados a partir de DOPC, la localización mayoritaria se encontró

en el carril correspondiente al 20% de sacarosa, zona donde cabría esperar la sedimentación de la proteína no asociada a los lípidos.

No obstante, los resultados obtenidos en la caracterización de proteína dependen de la reacción quimioluminescente entre la enzima peroxidasa y el cloronaftol en presencia de H_2O_2 , lo cual puede interpretarse como que las zonas donde se localice la proteína equivaldrán a las zonas donde se encuentre mayor concentración de la misma, por lo que no se puede descartar que no exista presencia de la misma en otras fracciones del gradiente.

Debido a que un exceso de lípido funcional podría conducir a la inestabilidad estructural de la bicapa, los resultados arriba descritos sugieren una formulación optimizada de la membrana en base a la siguiente composición lipídica:

Lípido	Porcentaje (w/w)	Función
DOPC(cabeza zwiterionica)	80%	Estructural
ox-PC (cola funcional)	10%	Ensamblaje ecuatorial covalente
POPG(cabeza aniónica)	10%	Ensamblaje superficial electrostático

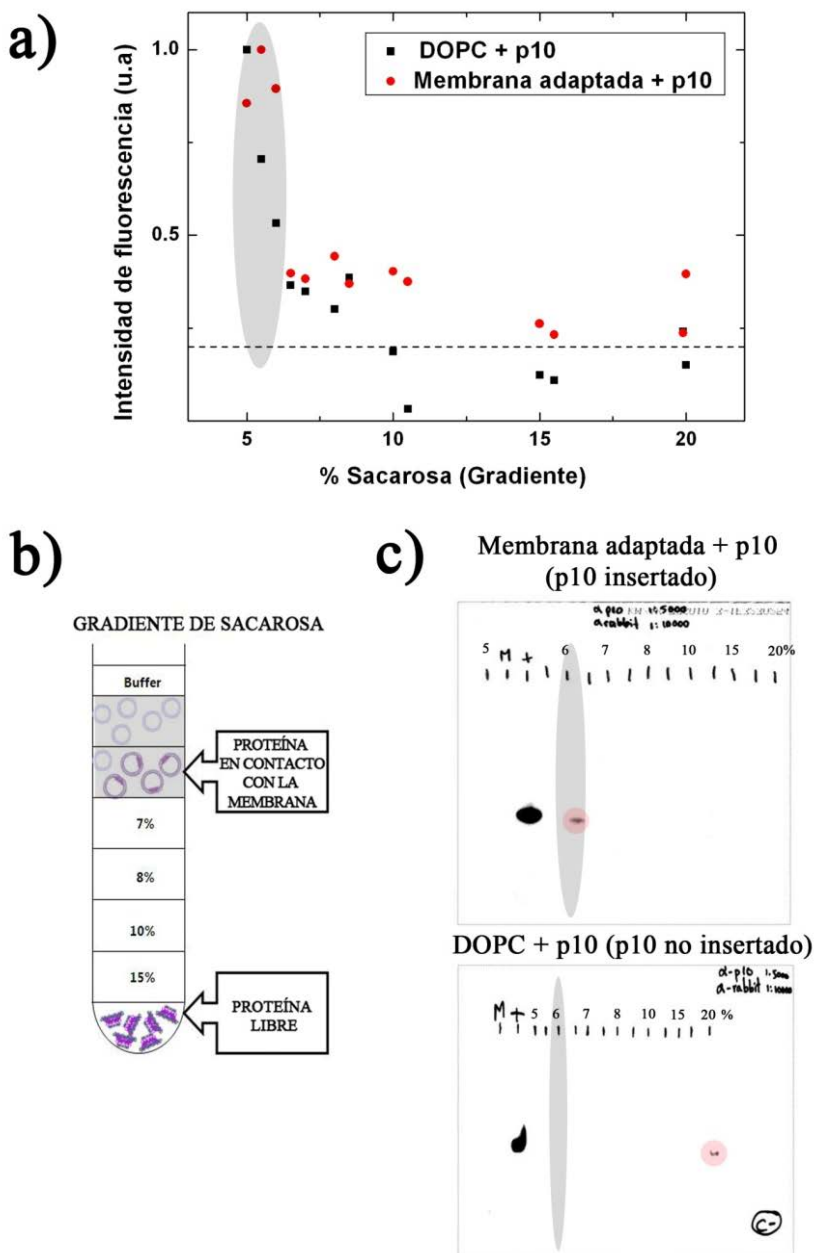


Fig. 1 a) Intensidad de fluorescencia lipídica (Rh-PE) en función del porcentaje de sacarosa del gradiente de sedimentación. b) Esquema del gradiente de sedimentación. c) Resultados del Western-Blot.

4.2 Detección mediante inmunofluorescencia.

Una vez determinada la formulación óptima de la membrana lipídica respecto a la reactividad superficial residual de p10, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia que permitieron localizar la presencia de la proteína p10 asociada a la superficie de vesículas gigantes, la realización final sobre la que se pretende construir el dispositivo funcional.

Para ello, se incubaron vesículas unilamelares gigantes electroformadas desde proteoliposomas en presencia de anticuerpos específicos contra p10 marcados con AlexaFluor488. Transcurridas 12 horas, se observó señal de fluorescencia en la superficie de las membranas de estas vesículas. La intensidad de esta fluorescencia era mayor respecto de la del medio circundante libre, lo que sugiere acumulación de los anticuerpos que reconocen la proteína p10 en la membrana de las vesículas (Ver Fig. 2.a). Como control negativo, estos mismos anticuerpos se pusieron en contacto con vesículas gigantes electroformadas a partir de los lípidos propuestos, pero en ausencia de la proteína p10, no se observó aumento alguno de la intensidad de fluorescencia. Asimismo, la distribución de los mismos en el medio era homogénea, por lo que no existía ningún tipo de reconocimiento inespecífico por parte de los anticuerpos hacia la membrana (Ver Fig 2.b).

Como control de la especificidad de los anticuerpos hacia la proteína p10, se pusieron vesículas con la misma composición que en el caso de la figura 2.a en presencia de un anticuerpo inespecífico (el cual no reconoce la proteína p10), en estos casos, tampoco se observó aumento de intensidad de fluorescencia en la membrana de las vesículas, por lo que se confirmó que la especificidad de los anticuerpos anti-p10 era la correcta.

Estos experimentos indican que la proteína p10 se encuentra en asociación con la bicapa lipídica, y además que esta interacción parece ser estable. Las vesículas gigantes unilamelares son creadas mediante electroformación a partir de membranas preformadas (proteoliposomas), por lo que la interacción de la proteína con la bicapa lipídica debe ser lo suficientemente fuerte como para poder soportar los procesos que conllevan la formación de las vesículas gigantes, tales como la deshidratación y su posterior hinchado en un campo eléctrico.

Asimismo, los resultados sugieren que la estructura del complejo se mantiene durante tales procesos ya que las zonas de reconocimiento por parte de los anticuerpos siguen manteniendo integridad tanto química como estructural, aspectos necesarios para el reconocimiento inmunológico.

En cuanto a la orientación de los conectores, y la disposición de los mismos en la membrana, a partir de estos experimentos no se pudo dilucidar nada al respecto, ya que el reconocimiento por parte de los anticuerpos no ofrece evidencias en cuanto a la integración en el interior de la membrana ni respecto a la geometría de esta inserción, si la hubiera.

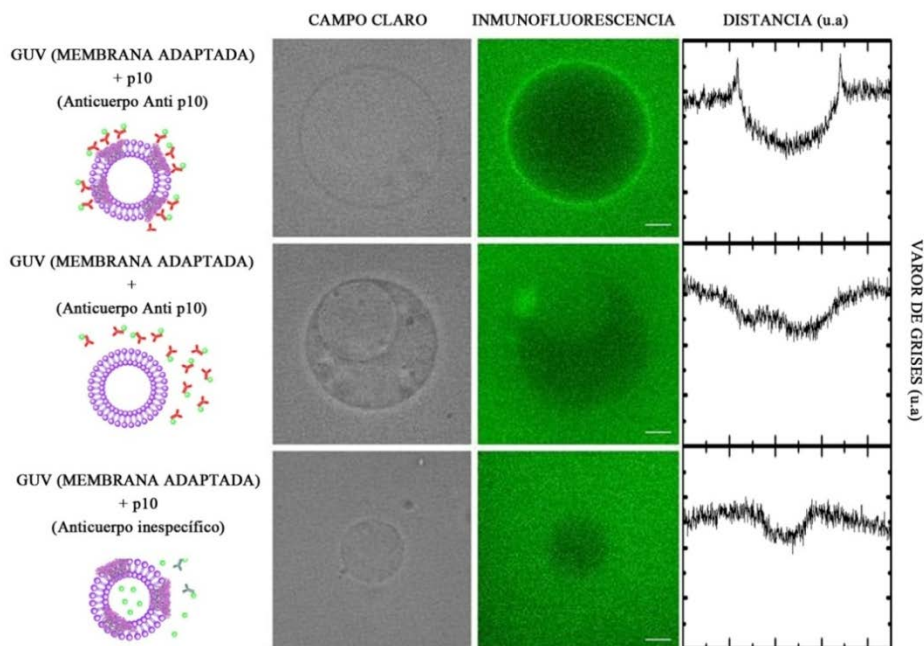


Fig. 2. Resultados del reconocimiento mediante anticuerpos. Los perfiles de intensidad muestran la acumulación de anticuerpos en la membrana (positivo) respecto de la distribución homogénea con el medio libre circundante (línea de rayas). A) Test positivo. GUV-*p10* + Anticuerpo anti-*p10*. Se observa acumulación de fluorescencia en la membrana. B) Control negativo: GUV en ausencia de *p10* + Anticuerpo anti-*p10*. No se observan diferencias en la membrana respecto al medio circundante. C) GUV + Anticuerpo inespecífico. No se observa cambios de la membrana respecto del medio circundante.

4.3 Resultados de los test de permeabilidad

4.3.1 *Resultados de pérdida selectiva de tamaño en vesículas grandes (LUVs)*

Por su propia naturaleza, las bicapas lipídicas ejercen la función de barrera de permeabilidad frente a moléculas hidrófilas. De hecho, el intercambio de moléculas hidrófilas a través de la bicapa solo ocurre mediante transporte activo a través de proteínas transportadoras o proteínas canal, que posibilitan el transporte a través de un poro hidrofílico perforado en la membrana. El agua y otras moléculas polares no cargadas de tamaño discreto, representa un caso singular de permeabilidad membranaria, en tanto que las bicapas lipídicas presentan cierta permeabilidad residual frente a estas moléculas, las cuales pueden atravesar con relativa facilidad la barrera hidrofóbica del interior de la membrana. Es por esta razón que las vesículas lipídicas y en general las membranas biológicas son osmóticamente activas respecto al transporte de agua [1]. Así, una vesícula lipídica es capaz de inflarse en medio hipotónico, y vaciarse en medio hipertónico, siendo la permeabilidad parcial al agua la responsable del transporte de esta molécula a favor del campo producido por un gradiente de concentración a ambos lados de la membrana.

Teniendo en cuenta tales características, se planteó un experimento que fuera capaz de dilucidar si la integración y posición del conector phi29 en su interacción con la bicapa lipídica son adecuadas para producir transporte de solutos hidrofílicos, tanto en la ubicación preliminar en los proteoliposomas de partida formados por extrusión, como en la realización definitiva sobre vesícula gigante. Para ello, se prepararon vesículas encapsulando dos fluoróforos de diferente tamaño y por tanto con diferente permeabilidad a través del poro. En primer lugar se utilizó calceína, un fluoróforo molecular de bajo peso molecular (622,53 Da) bien conocido en la literatura por ser soluble en agua y no ser permeable a la membrana lipídica [2]. Sin embargo, el reducido tamaño de esta molécula ($< 2\text{nm}$) posibilita su transporte a través de canales de membrana. De hecho, la elección de este fluoróforo se hizo con la finalidad de que pudiese atravesar el canal interior de 3 nm de diámetro formado por el complejo proteico *p10*.

Como fluoróforo de gran tamaño, se escogió la sonda polimérica rodamina-dextrano, el cual consiste en una molécula de rodamina anclada en posición terminal a una cadena polimérica de dextrano de gran tamaño molecular ($M_w = 70\text{ kDa}$). Dadas las

grandes dimensiones de este ovillo polimérico disuelto en agua ($R_g \approx 20$ nm), el mismo no debería ser capaz de atravesar el estrecho canal interior existente en el eje del conector (≤ 3 nm).

Mediante microscopía confocal, se observaron dos muestras de LUV's encapsulando ambos fluoróforos simultáneamente, en presencia y en ausencia de *p10*, elaboradas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1.3.1 del capítulo de materiales y métodos.

Para el caso control (vesículas en ausencia de *p10*; ver Fig. 3 (A,B)), se observó la retención del fluoróforo tanto en el canal de la calceína como en el canal de la rodamina, por lo que se evidenció la retención de la sonda en el interior de las vesículas incluso tras 24 h después de su formación.

En los resultados de las muestras con vesículas interaccionando con *p10* (ver Fig. 3 (C, D)), se observaron evidentes diferencias respecto de las muestras control. En el canal de calceína, se observaron muestras homogéneas en cuanto a intensidad de fluorescencia; lo cual fue interpretado como una fuga de calceína (fluoróforo pequeño), la cual puede difundir desde dentro hacia fuera de las vesículas a través de los poros conformados por el complejo proteico *p10*, hasta llegar a un nivel de equilibrio donde la intensidad de fluorescencia estaría equilibrada entre el interior y el exterior de la vesícula, circunstancia que impide la visualización de las vesículas sobre un fondo de fluorescencia homogénea .

En el caso del canal de rodamina-dextrano (sonda de gran tamaño), la intensidad de fluorescencia volvió a mostrar heterogeneidad en la fluorescencia (al igual que en la muestra control sin *p10*), por lo que se pudo confirmar que la difusión de la rodamina se encuentra impedida entre el interior y el exterior de las vesículas, los canales siendo suficientemente angostos como para posibilitar la salida del fluoróforo polimérico. (Ver Fig. 3).

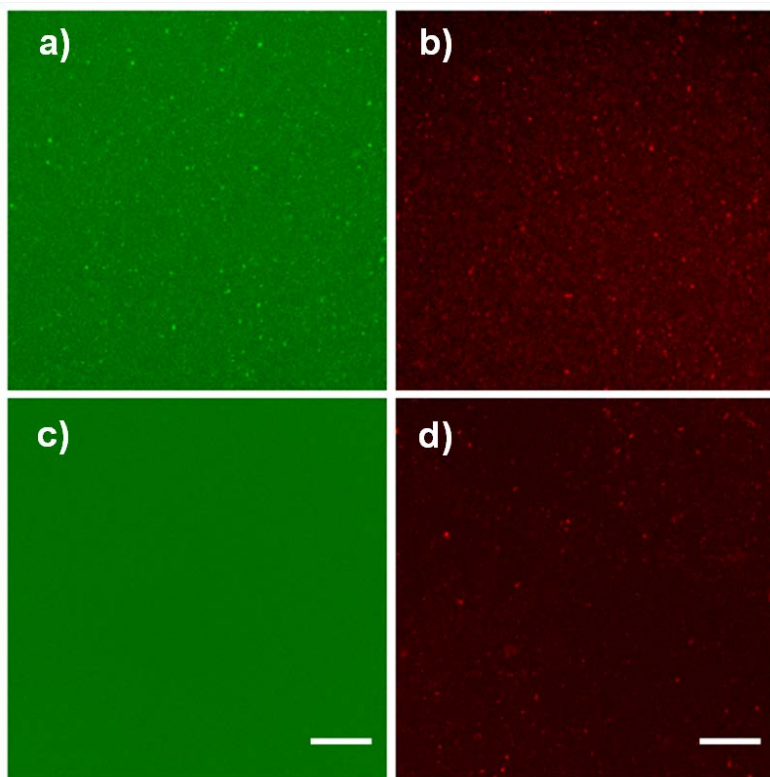


Figura 3. Imágenes de liposomas encapsulando calceína (canal verde, fluoróforo de bajo peso molecular) y rodamina-dextrano (canal rojo, fluoróforo de alto peso molecular) por microscopía confocal. Las imágenes (a) y (b) muestran liposomas en ausencia de conectores, quedando atrapados los fluoróforos en el lumen de las vesículas. En las imágenes (c) y (d) se observan los mismos canales de fluorescencia para la situación de liposomas en presencia de la proteína p10. En este caso puede observarse cómo la calceína no queda retenida en el lumen de las vesículas (c), mientras que la rodamina dextrano sí lo hace (d), poniendo en evidencia la integración ortogonal de los poros los cuales permiten el paso de pequeñas moléculas.

Estos experimentos confirmaron que la interacción existente entre p10 y la bicapa lipídica tras la formación de las vesículas grandes unilamelares mediante co-extrusión, ocurre en condiciones de inserción de la proteína en el interior de la bicapa, y que estas inserciones, además, ocurren mayoritariamente con orientación ortogonal.

Otro detalle que se puede destacar de estos experimentos, es que tras 24 h se sigue manteniendo la integridad física de estas vesículas tanto en presencia como en ausencia de proteína, incluso tras ser sometidas a fuerte dilución. Esta remarcable estabilidad en medio hipotónico es consecuencia indirecta de la existencia de poros. En caso contrario, la dilución produciría la ruptura por lisis directa de las vesículas por entrada de agua sin intercambio de material del interior de la misma.

4.3.2 Conexión por poros de membrana entre compartimentos internos

La realización de estos experimentos se llevó a cabo con el objetivo a) de dilucidar si los canales observados en el apartado 4.3.1 en vesículas grandes (LUV's) mantienen su integridad cuando se forman las vesículas gigantes a partir de las mismas, b) determinar la posible conexión entre compartimentos acuosos en elementos multilamelares de gran tamaño. En el apartado 4.2, mediante reconocimiento a través de anticuerpos, se observaron indicios de que tras la formación de vesículas gigantes mediante electroformación, la proteína p10 seguía manteniendo su interacción con la bicapa lipídica, y que esta interacción parecía preservar su estructura. Basándonos en estos indicios, se realizó un experimento en el que se hacía uso de una sonda de carácter lipófilo, FM 1-43, la cual está muy estudiada en la bibliografía como sonda de referencia para procesos de endocitosis y exocitosis [3]. Esta sonda es totalmente soluble en agua y con cierta afinidad sobre superficies membranas, presentando emisión fluorescente de alto rendimiento cuántico únicamente en entornos parcialmente hidrófobos. Cuando la sonda está localizada en un entorno acuoso, la emisión fluorescente se encuentra totalmente inhibida por quenching no radiativo con el disolvente, por lo que el rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye drásticamente, es decir, la sonda no fluoresce. Otra peculiaridad de la misma, se debe, a que pese a su relativa afinidad por entornos lipófilos, no atraviesa las bicapas lipídicas sino que permanece retenido en la superficie de ellas. Es por este hecho que, cuando FM1-43 se encuentra en contacto físico con bicapas lipídicas únicamente es capaz de interaccionar con la capa externa de lípidos, siendo incapaz de atravesar la barrera hidrófoba que constituye la membrana. La interacción con la superficie de membrana le hace perder parcialmente la capa de agua de hidratación, hecho que posibilita la emisión fluorescente, siendo sin embargo completamente imposible su permeación a través del interior hidrofóbico de la membrana.

Debido a las características arriba comentadas, la sonda FM 1-43 es solo capaz de atravesar la bicapa lipídica a través de poros de membrana. En tal caso, podría acceder

a compartimentos localizados en el lumen de las vesículas, solo si existen canales comunicando diferentes entornos o si se producen eventos activos de endocitosis[4]. En estos experimentos, se prepararon vesículas gigantes por el método de electroformación (véase Sec. 3.4.2, en el capítulo de materiales y métodos), tanto en presencia como en ausencia de la proteína *p10*. En estas preparaciones, mediante visualización en campo claro, se escogieron vesículas con carácter oligomelar (GOV's) y se comprobó su estructura multicompartimental mediante observación tomográfica realizada a diferentes alturas a lo largo del eje Z. Cuando la sonda fue añadida en el medio externo de glucosa en el que se diluían las vesículas para su observación por microscopía óptica de fluorescencia, la sonda es capaz de difundir libremente hasta alcanzar por afinidad las superficie externa de las estructuras lipídicas en contacto con el medio de dilución. Así, al inducir la fluorescencia por excitación de estas moléculas con luz longitudes de onda entre 510-560 nm (filtro verde), la sonda localizada en la superficie vesicular externa emite en el rojo con alto rendimiento de fluorescencia. Cuando las vesículas gigantes con estructura oligomelar fueron preparadas en ausencia de *p10*, la señal de fluorescencia sólo fue localizada en la capa externa de las vesículas, mientras que las bicapas localizadas en el lumen de estas vesículas no mostraban fluorescencia (Ver Fig.4.a).

Sin embargo, cuando se realizaron estas pruebas en vesículas con *p10* pudo observarse cómo la sonda era capaz de emitir fluorescencia en las estructuras membranarias situadas en el lumen de las vesículas oligomelares (Fig. 4.b). Este hecho confirmó que la difusión de la sonda FM 1-43 a través de las bicapas lipídicas está posibilitada por el canal interior conformado por el complejo proteico.

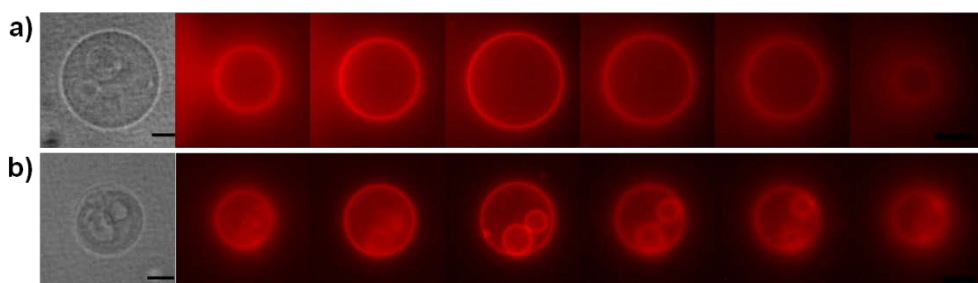


Fig. 4. Imágenes en campo claro y tomografías en el plano Z de vesículas oligomelares. En ellas se muestra como la sonda FM 1-43 sólo es capaz de teñir las vesículas localizadas en el lumen atravesando la membrana a través de canales (B), en ausencia de proteína, la sonda únicamente fluoresce en la membrana exterior.

4.3.3 Cinéticas de permeabilidad a calceína en GUV's

Una vez confirmada la incorporación del conector de *phi29* en el interior de las bicapas lipídicas de vesículas gigantes en condiciones de orientación ortogonal con permeabilidad positiva frente a solutos de pequeño tamaño ($\leq 3\text{nm}$), se hizo un estudio sobre la eficiencia de dicha incorporación empleando una bicapa lipídica químicamente adaptada a la superficie del conector. Para ello, se hicieron estudios cuantitativos de permeabilidad a través de los poros con las sondas empleadas en el apartado 4.3.1 en vesículas gigantes (calceína y rodamina-dextrano). Para comprobar si la inserción era más eficiente, se realizaron estudios comparativos de la inserción utilizando lípidos cargados respecto de la inserción en bicapas lipídicas inertes tal y como se sugirió en el trabajo realizado por el grupo de Guo *et al* [5].

En ese trabajo se propone la inserción mediante el empleo de membranas únicamente compuestas de DOPC; estos liposomas son formados a través de simple incubación de los lípidos en presencia de la proteína *p10* en una proporción relativa alta (el ratio molar P/L = 1/75 corresponde a una proporción alta de proteína frente a lípido, mientras que P/L = 1/37000 corresponde a una situación diluida). Como primera prueba de eficiencia sobre la utilización de lípidos oxidados, se realizó una comparación entre vesículas gigantes creadas mediante electroformación a partir proteoliposomas conteniendo lípidos cargados y proteoliposomas con DOPC (ambos elaborados mediante el mismo proceso de co-extrusión y en el mismo ratio P/L = 1/37,000). Siguiendo la metodología detallada en el apartado 5.5.1.2 del capítulo de materiales y métodos se tomaron fotografías en fluorescencia a lo largo del tiempo con los respectivos filtros de fluorescencia. En la Figura 5 se muestran los resultados observados en cada situación para una vesícula típica. Cuando las vesículas estudiadas contenían lípidos cargados en presencia de *p10* (❶), los niveles de fluorescencia inicial eran relativamente débiles, lo cual sugería que la pérdida de fluorescencia era tan rápida que durante el corto periodo de preparación ya se estaba produciendo una gran pérdida del fluoróforo a través de los canales. Tras las siguientes dos instantáneas (2 minutos después del comienzo del experimento), los niveles de intensidad entre el lumen y el medio circundante a las vesículas ya estaban prácticamente igualados, lo cual evidenció que la pérdida del fluoróforo se estaba produciendo a gran velocidad. En las siguientes instantáneas (tiempos mayores de 2 min.), la pérdida de contenido se había producido tan eficientemente que el medio circundante a la vesícula comenzaba

a observarse más brillante que en el lumen de las vesículas, provocando que la intensidad de fluorescencia en los análisis ($\delta_{\infty} < 0$), comenzase a hacerse negativa. Estos valores negativos son debidos a la imposibilidad de difundir libremente la sonda en el lumen de las vesículas, produciendo el apagamiento relativo de la sonda en su interior respecto del exterior donde es continuamente renovada desde el reservorio de la disolución. En otras palabras, cuando se encuentra en el medio exterior, la sonda es capaz de difundir libremente, y las moléculas que se localizan en el exterior son reemplazadas continuamente.

En el caso de las vesículas formadas a partir de lípidos inertes (DOPC) (❷), la intensidad de fluorescencia, al igual que en el caso anterior, mostró que en el momento del análisis (t_0), ya se ha producido algo de pérdida del fluoróforo, indicando que también se produce pérdida de fluoróforo a través de los canales; pero en estos casos, esta pérdida se produce más lentamente.

Estos resultados, confirmaron de forma cualitativa que la introducción de lípidos cargados en la membrana favorece la inserción del conector en la bicapa.

Para evitar sesgos en la medida, se tomaron como controles vesículas formadas a partir de lípidos cargados (❸), pero en ausencia de *p10*. En estas vesículas, la sonda no es capaz de permear a través de la membrana, por lo que nos suministraron información sobre la pérdida intrínseca de la sonda debido al fotoblanqueo.

Al igual que en los experimentos de pérdida selectiva en función del tamaño en vesículas grandes (véase apartado 4.3.1), las vesículas gigantes se formaron encapsulando una sonda de tamaño mayor al diámetro del canal, esto nos permitió corroborar que la pérdida de la sonda de menor tamaño (calceína), se estaba produciendo adecuadamente a través de los canales.

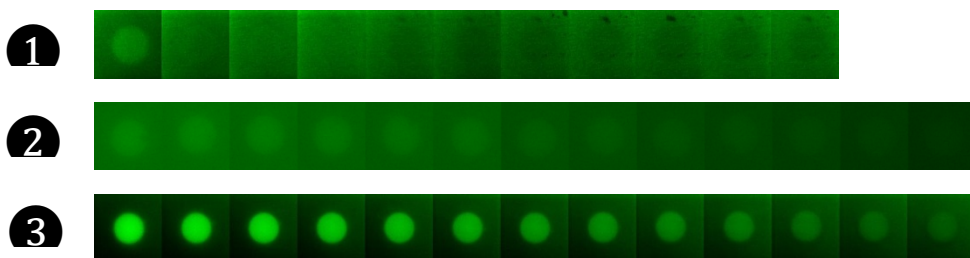


Fig. 5. Secuencia de imágenes de las vesículas típicas encontradas en cada caso para los estudios de cinética de permeabilidad para el fluoróforo calceína. (❶) Vesícula de *p10* con membrana adaptada. (❷) Vesícula con *p10* en membrana inerte (DOPC) y (❸) Membrana adaptada en ausencia de *p10*.

Los resultados numéricos obtenidos de los experimentos anteriores se muestran en la figura 6. En ella pueden observarse las cinéticas obtenidas tras el análisis de grupos de entre 15-20 vesículas para cada caso de los anteriores (figura 5). Como estudio semi-cuantitativo de eficiencia de integración, se observa que en el empleo de lípidos oxidados mediante la estrategia de enlace covalente con el conector (❶), el tiempo de decaimiento característico, cuando el ratio P/L era de 1/37,000 era bastante corto ($\tau_{\text{react}} \approx 2$ min) (definiendo la vida media como δ ($t = \tau_{1/2}$) = 1/2) (Línea punteada). Sin embargo, a iguales ratios P/L, el empleo de membranas inertes, o lo que es lo mismo, membranas no reactivas (solo DOPC) (❷), se observa que el tiempo de decaimiento se hace mucho más lento ($\tau_{\text{no-react}} \approx 12$ min), asemejándose bastante al decaimiento observado para el caso de pérdida de intensidad por fotoblanqueamiento (❸).

Que el tiempo de decaimiento se haga más largo (casi similar a los valores obtenidos por la pérdida de intensidad por fotoblanqueamiento) sugiere que las moléculas de calceína permean hacia el exterior por un número muy reducido de conectores, por lo que la utilización de membranas reactivas y la puesta en contacto físico mediante la técnica de co-extrusión mejoran considerablemente la eficiencia. Teniendo en cuenta esto último, si se asume que la cantidad de difusión de la calceína al medio circundante, es proporcional al número de conectores insertados, puede estimarse que $Q_{\text{react}}/Q_{\text{no-react}} \approx \tau_{\text{no-react}}/\tau_{\text{react}} \approx 6$. Asumiéndose, que a iguales ratios, la utilización de membranas reactivas es 6 veces más efectiva que la utilización de una membrana no reactiva.

Se realizaron también estudios de inserción de proteína en membranas reactivas utilizando diferentes ratios P/L (1/3,700; 1/37,000; 1/370,000) para comprobar si existía una correlación cuantitativa entre la cantidad de conectores insertados y la permeación de calceína a través de los mismos. Los resultados, pueden observarse también en la figura 6 (círculos vacíos de diferentes colores) donde se aprecia, que la cantidad de proteína integrada aumenta a medida que aumentamos el ratio (el tiempo de decaimiento de las cinéticas se hace más rápido).

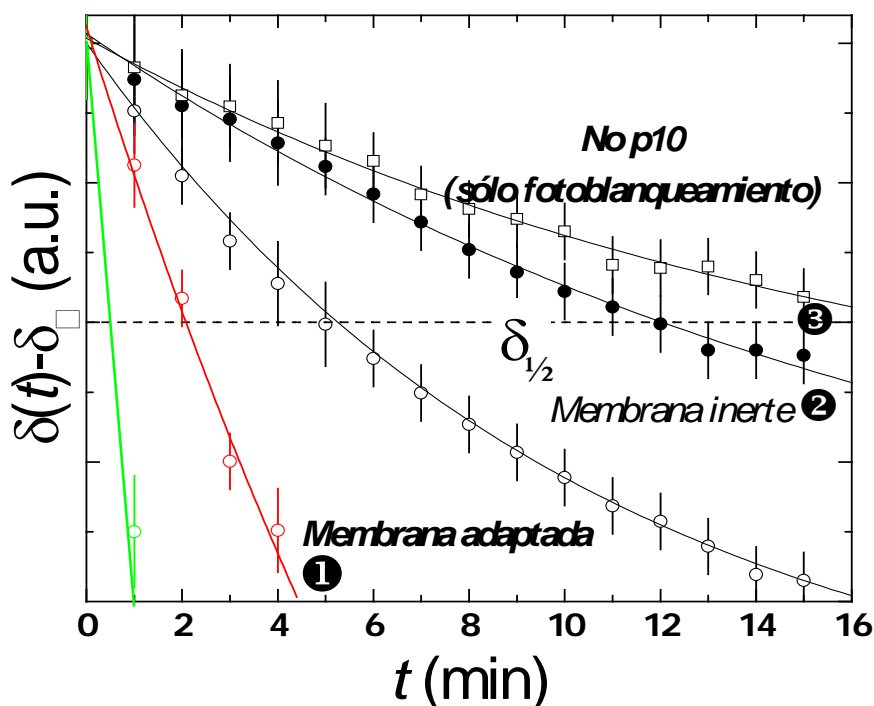


Figura 6. Cinéticas de permeabilidad para la sonda calceína. Se muestra el decaimiento de los valores de intensidad normalizados en función del tiempo para diferentes experimentos. **1** p10 integrado en membranas reactivas (ratio 1/37,000); **2** p10 integrado en membranas de DOPC (ratio 1/37,000); **3** membrana reactiva en ausencia de p10 (control). Se muestran también tres ratios diferentes P/L para el caso de las membranas reactivas: 1/3,700 (verde, \circ); 1/37,000 (rojo, \circ); 1/370,000 (negro, \circ). La línea horizontal discontinua representa el nivel de vida media para la estimación del tiempo característico $\delta(t) = \delta_{1/2} = 1/2$ en el instante $t = \tau_{1/2}$. Las líneas continuas representan una guía visual simple. Los valores experimentales corresponden a un promedio de vesículas diferentes para cada caso experimental. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

4.3.4 Cinéticas de permeabilidad a rodamina-dextrano en GUV's

Al igual que en el apartado 4.3.1 para el caso del estudio de pérdida de sondas fluorescentes a través de poros en vesículas grandes (LUV's), las vesículas gigantes (GUV's) estudiadas en el apartado anterior, también se formaron encapsulando un fluoróforo unido a un polímero de tamaño mayor al diámetro del canal del conector (Rodamina-dextrano).

En la figura 7 se observa cómo en los tres casos, la pérdida de intensidad, sólo es debida al fotoblanqueamiento de la sonda, confirmandose, que la sonda rodamina-dextrano no es capaz de atravesar los poros generados por el ensamblaje de la proteína *p10*, y que la permeabilidad observada en las vesículas analizadas en el apartado 4.3.3 es debida a la difusión a través de los canales y no a anomalías estructurales de las vesículas gigantes en su bicapa. Gracias a los experimentos de permeabilidad a través del canal del conector, se ha podido llegar a la conclusión de la gran reproducibilidad de la inserción en presencia de lípidos oxidados, así como la posición ortogonal del mismo en la bicapa. También se ha podido comprobar que la tasa de inserción es 6 veces más alta cuando se utilizan lípidos oxidados que únicamente con la utilización de lípidos neutros.

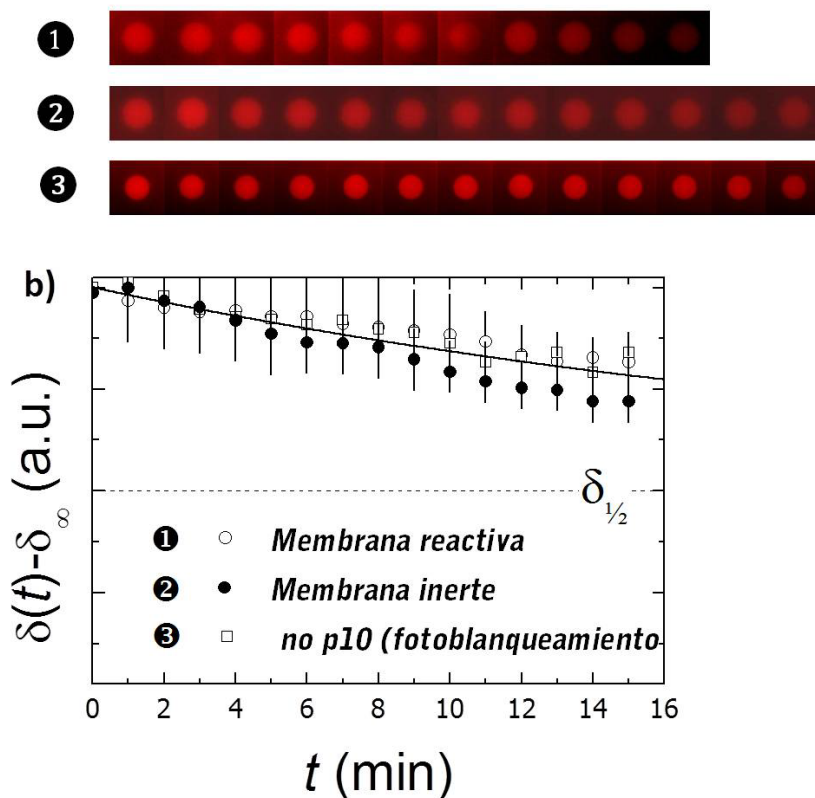


Fig. 7. (a) Secuencia de imágenes de las vesículas típicas encontradas en cada caso para los estudios de cinética de permeabilidad para el fluoróforo Rodamina-dextrano. (1) Vesícula de *p10* con membrana adaptada. (2) Vesícula con *p10* en membrana inerte (DOPC) y (3) Membrana adaptada en ausencia de *p10*. (b) Cinéticas de permeabilidad para los tres situaciones, en ellas puede apreciarse que la sonda queda retenida en el lumen de las vesículas y los decaimientos son debidos al fotoblanqueamiento.

4.4 Caracterización mediante Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM)

Con la intención de caracterizar en mayor profundidad la inserción física del conector en la bicapa lipídica, se estudio su integración a escala nanoscopica mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Con el fin de descartar la posible segregación lateral de los lipidos a lo largo de la bicapa, se fusionaron liposomas constituidos únicamente por la mezcla lipídica reactiva sobre una lámina de mica (la fusión al sustrato sólido y la posterior observación se realizaron mediante los procedimientos descritos en el apartado X de materiales y métodos). En el caso de la bicapa lipídica soportada sobre mica pudo observarse que la distribución lateral de los lípidos a lo largo de la capa lipídica es bastante homogenea. Asimismo, el espesor de la membrana se determinó en un valor de 4 nm, correspondiente al grosor esperado para una bicapa lipídica.

En la figura 8 se muestra una imagen típica de las obtenidas para suspensiones liposomales fusionadas sobre mica en ausencia de proteína. Intencionadamente se ha escogido una imagen en la que se muestra una deposición heterogénea sobre la superficie de mica, la cual permite el estudio del espesor de la membrana por comparación con la profundidad de los defectos en la misma. A la derecha, se observa el perfil de alturas correspondiente a la zona marcada sobre la imagen (línea azul). En él se aprecia una distribución homogenea de los lípidos en la membrana, con una rugosidad del orden de unos pocos Ångström, a excepción de la zona de ruptura en la que se observa que la profundidad de la misma bicapa corresponde a 4 nm.

Para las muestras de proteoliposomas, se utilizaron disoluciones con diferentes ratios P/L con la finalidad de evidenciar visualmente el aumento de integración en función del ratio confirmado en las cinéticas de permeabilidad del apartado anterior. En las imágenes de AFM, encontramos tres tipos de estructuras en función del tipo de interacción existente entre el conector y la bicapa (Ver Fig. 9). Cuando el conector interacciona en condiciones de inserción en el interior de la bicapa (configuración α), a su vez, en función del grado de altura y el diámetro encontrados, dos tipos conformacionales pueden ser discriminados en las imágenes. Cuando el conector se inserta con su zona más ancha o alada orientada hacia el medio circundante del liposoma ($\alpha+$) encontramos unas alturas de 2,5 nm y unos diámetros de alrededor de 30 nm aproximadamente. Cabe resaltar, que los diámetros esperados para ese tipo de inserción deberían ser menores, ya que el diámetro de esta zona corresponde a 14,6

nm, pero debido al tipo de punta utilizada durante la caracterización y a la dureza reducida del sistema, la resolución lateral de las medidas en el plano XY es sensiblemente inferior ($\delta_{xy} = \pm 10\text{nm}$) no es tan fiable como la recogida a lo largo del eje Z ($\delta_z = \pm 0.2\text{nm}$), por lo que es razonable obtener valores efectivos del diámetros más altos que los esperados. Cuando la zona alada queda orientada hacia el lumen del liposoma (situación que en lo sucesivo denominaremos, conformación inversa (α^-)), las alturas y diámetros esperados corresponden a 1 nm y 10 nm, respectivamente. Sin embargo, cuando el conector no está insertado en la bicapa (configuración β), aunque pudiera encontrarse parcialmente sumergido en la superficie blanda de la membrana, se observa sobresaliendo sistemáticamente una alturas de aproximadamente 7 nm.

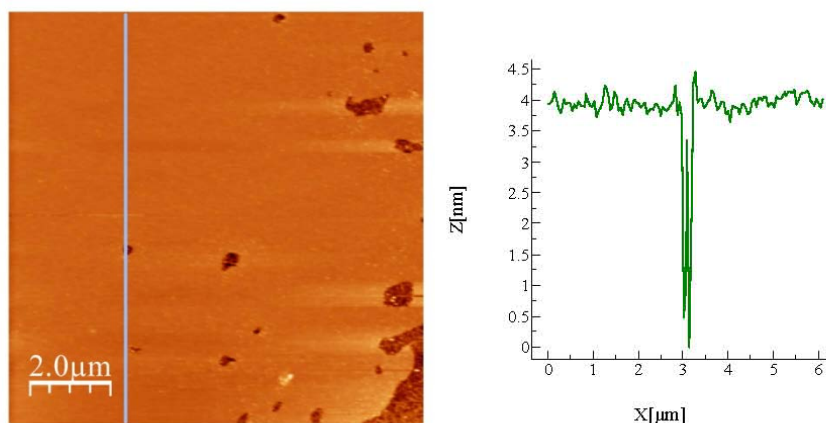


Fig. 8. (a) Imagen representativa de una bicapa lipídica con lípidos cargados sobre la superficie de mica. Las zonas más oscuras corresponden a zonas donde la bicapa no se ha fusionado permitiendo la obtención de los espesores de la misma.. (b) Perfil de alturas correspondiente a la línea azul, se observa una bicapa homogénea salvo en el hueco, detectando una altura de 4 nm aproximadamente.

En concordancia con las topologías comentadas, en la figura 9, encontramos 28 posibles conectores, dentro de los cuales, hemos reconocido un número de 17 con topología α^+ (60%), 10 con topología α^- (35,3%) y sólo 1, claramente con topología β (4,7%). La existencia de un mayor porcentaje con topología α^+ puede ser debido a que en el momento de los análisis, se encontraron unas estructuras intermedias que según su altura corresponderían a conformaciones α^+ , pero que no llegaban a contener los diámetros esperados para esta conformación. Estas estructuras fueron

contabilizadas como estructuras $\alpha+$, pero es de esperar que debido a la fluidez y labilidad de la bicapa, esas estructuras correspondan a posiciones $\alpha-$, en las cuales, la bicapa se adapta adquiriendo cierto grado de curvatura alrededor del conector (Véase Fig. 9), por lo que consideramos que el grado de inserción entre $\alpha+$ y $\alpha-$ es bastante similar.

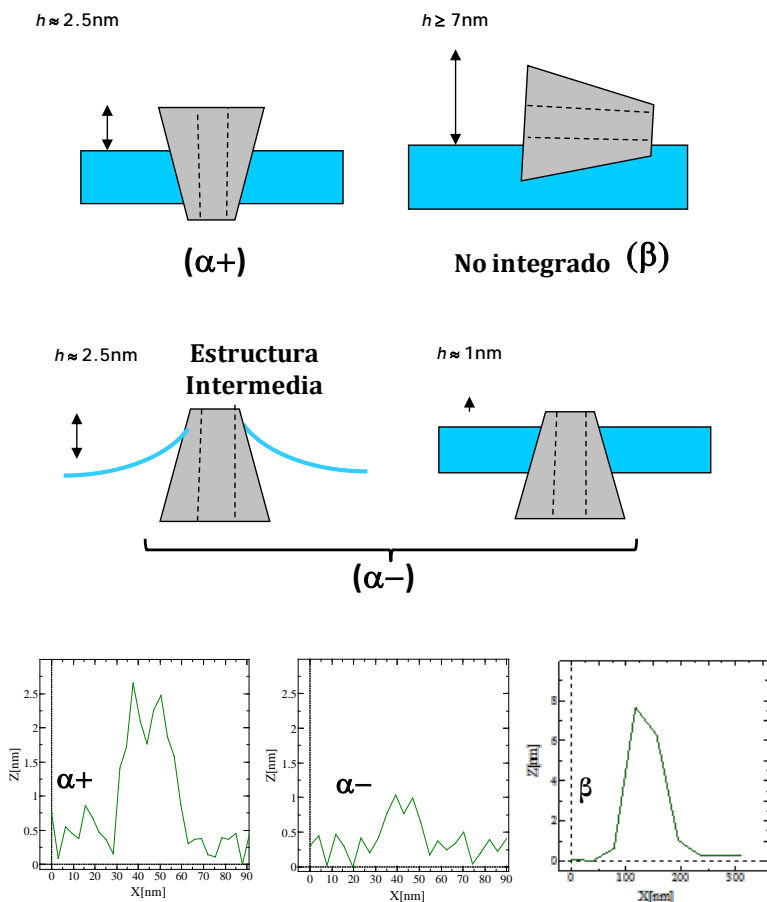


Fig. 9. Interpretación de las posiciones del conector sobre la bicapa, $\alpha+$, $\alpha-$ y β junto a sus respectivos perfiles de alturas.

En la figura 10 se muestra una imagen representativa de las obtenidas a un ratio $P/L=1/37,000$. Haciendo un recuento sobre una sección con área $1\text{ }\mu\text{m}^2$ a mayor resolución de esa imagen (derecha), se observan 28 estructuras concordantes con las comentadas anteriormente ($N_p=28$). Conociendo el número de conectores insertados (N_p) respecto del número de moléculas de lípido en ese sector (N_l), puede estimarse la

densidad superficial de proteína integrada con respecto al número de lípidos mediante N_P/N_L . El número de lípidos, debe considerarse como

$$N_L = \frac{(S - N_P A_P)}{a_L} \quad (1)$$

El cual es determinado principalmente por el área molecular de la molécula de lípido ($a_L \approx 0,8 \text{ nm}^2$) [6, 7]. La densidad de lípidos debe ser corregida por un factor (N_{Pap}) que tenga en cuenta el área ocupada por las moléculas de proteína, teniendo en cuenta que la estructura del conector es circular, puede calcularse como $p = \pi R^2 \approx 167 \text{ nm}^2$; ($R \approx 7.3 \text{ nm}$).

Por lo que, en la zona analizada en la figura 10, calcula que la densidad superficial de proteína integrada corresponde a

$$\frac{N_P}{N_L} = \frac{N_P a_L}{(S - N_P a_p)} \approx 2 \cdot 10^{-5} \quad (2)$$

Lo cual correspondería a una tasa de incorporación aproximada del 74%. Un valor ligeramente inferior a una tasa de incorporación del 100 % en un ratio P/L 1/37,000 ($2,7 \cdot 10^{-5}$). En la figura 10 (B1) se muestra una imagen representativa con un ratio P/L 1/5,000. Sobre esa imagen se hizo un recuento de los conectores incorporados y se calculó su tasa de incorporación. Para un área de $4 \mu\text{m}^2$ calculó una tasa de incorporación de $\approx 2 \cdot 10^{-4}$, lo cual resultó ser muy parecido al resultado esperado cual $P/L = 2 \cdot 10^{-5}$, en la figura B2 se muestra una ampliación en la que se puede observar mediante comparación directa con la A2 el aumento de inserción en función del ratio para un mismo área.

Gracias a los experimentos de caracterización por AFM se pudo confirmar cómo la cantidad de proteína integrada en la bicapa aumenta en función del ratio P/L, así como que la tasa de incorporación de la misma corresponde a un 75% cuando se utilizan lípidos oxidados. Asimismo, también se ha obtenido información de la posición del conector respecto de la bicapa, pudiéndose estimar qué zonas del mismo pueden ser susceptibles de poder interactuar con el resto de la maquinaria para su puesta en funcionamiento. Según la información obtenida sobre el grosor de la bicapa lipídica y la superficie libre del conector, podría ser posible que las moléculas de pRNA se ensamblaran permitiendo la interacción de la terminasa y la completa actividad del mismo. En la siguiente sección se discutirán los esfuerzos realizados para la elaboración del mismo.

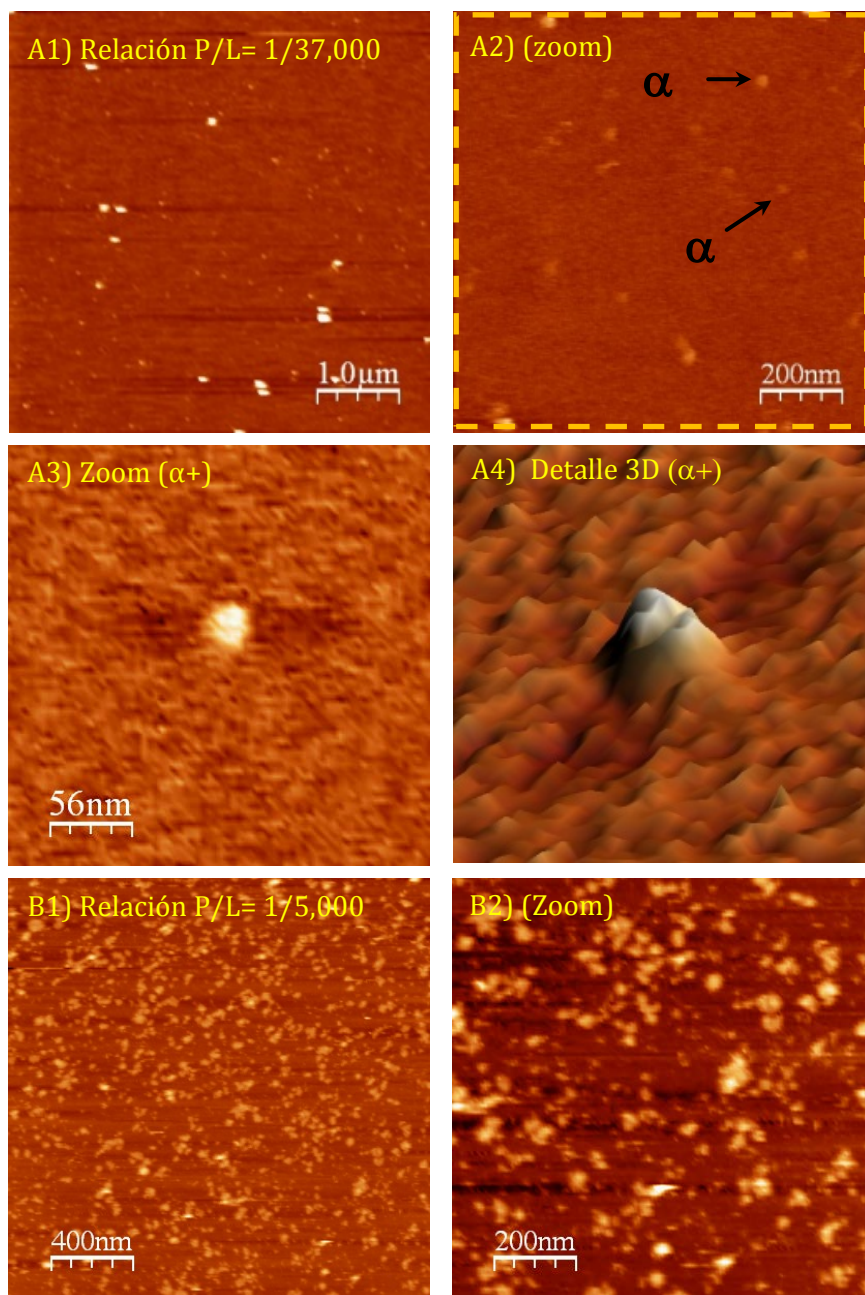


Figura 10 A)1, 2,3 y 4. Imagen de una bicapa lipídica con p10 a un ratio 1/37,000, la secuencia de imágenes se va ampliando hasta llegar a una reconstrucción 3D de la imagen B1. B) Imagen de la bicapa con p10 a un ratio 1/5000

4.5 Análisis mecánico

Una vez caracterizada la inserción ortogonal del conector p10 en la membrana mediante técnicas de análisis bioquímico y determinada su capacidad de poración de pequeñas moléculas, se propuso el estudio del impacto de dicha permeabilidad incrementada sobre la mecánica de la membrana. Desde un punto de vista simplista, se espera que la existencia de canales abiertos en la membrana tenga consecuencias directas sobre la permeabilidad de sustancias a través del canal del conector. Por tanto, serían esperables influencias directas sobre la dinámica de los movimientos de la membrana, lo cual podría de forma indirecta, modificar las propiedades mecánicas de la membrana. En base a la teoría de mecánica de membranas comentada en el capítulo de introducción, en este capítulo se han realizado estudios de mecánica de membrana mediante deformaciones con micropipetas y estudios de fluctuaciones térmicas.

4.5.1 Estudios de aspiración con micropipetas.

A través de los estudios realizados mediante experimentos de micropipetas, según las teorías desarrolladas por Manneville *et al* y Evans *et al* [8, 9] (Véase la sección 3.6.1.2 en Materiales y Métodos), el estudio de deformación directa por aspiración en micropipeta arrojó un primer resultado sobre el impacto de la inserción del conector en las propiedades mecánicas de estas membranas. Para ello, se realizaron estudios de aspiración en vesículas de dos composiciones diferentes, vesículas únicamente compuestas por la membrana adaptada con lípidos oxidados (DOPC/POPG/PAzPC) y vesículas con el conector p10 insertado en la membrana (por lo tanto, vesículas con canales abiertos en la membrana comunicando el medio interno con el medio externo). Las primeras diferencias experimentales se encontraron cuando se aspiraron vesículas con la proteína p10. En este caso, la tensión de membrana se vio fuertemente disminuida con respecto al valor característico de vesículas compuestas únicamente por componente lipídico. Un ejemplo de este hecho se observa en la figura 11, donde se muestra como la longitud de la lengua formada al aspirar las vesículas va incrementándose en función de la presión de succión ejercida por la micropipeta. En la fila superior se muestra el seguimiento de una vesícula con p10 de $r \approx 20 \mu\text{m}$ donde la lengua llega a longitudes de $18 \mu\text{m}$ sin llegar a alcanzar la tensión de ruptura, mientras que en la fila inferior se muestra un experimento para una vesícula conteniendo únicamente lípidos con un $r \approx 15 \mu\text{m}$ donde la tensión de ruptura es alcanzada a deformaciones más pequeñas.

Asimismo, realizando el análisis matemático de los experimentos en base a los fundamentos introducidos por Evans *et al* [10], se observó que nuestro sistema presenta grandes deformaciones en el régimen de curvatura. De hecho, en nuestros experimentos no fuimos capaces someter las vesículas al régimen de tensión subsiguiente al régimen inicial controlado por curvatura, no siendo por tanto capaces de utilizar el método para determinar el módulo de compresibilidad característico de nuestras muestras (k_a). Por las condiciones de nuestros experimentos, observamos que las vesículas únicamente se encontraban en el régimen de curvatura (Figura 4.12b), con lo cual, en las representaciones del $\ln \alpha$ frente al estiramiento $\Delta A/A$, pudimos obtener según la relación dada por estos autores el módulo de curvatura (κ). En la Figura 12a se muestran los resultados para los dos casos, en los cuales, se observa cómo la tensión ejercida para conseguir un estiramiento similar radicalmente diferente en ambos casos.

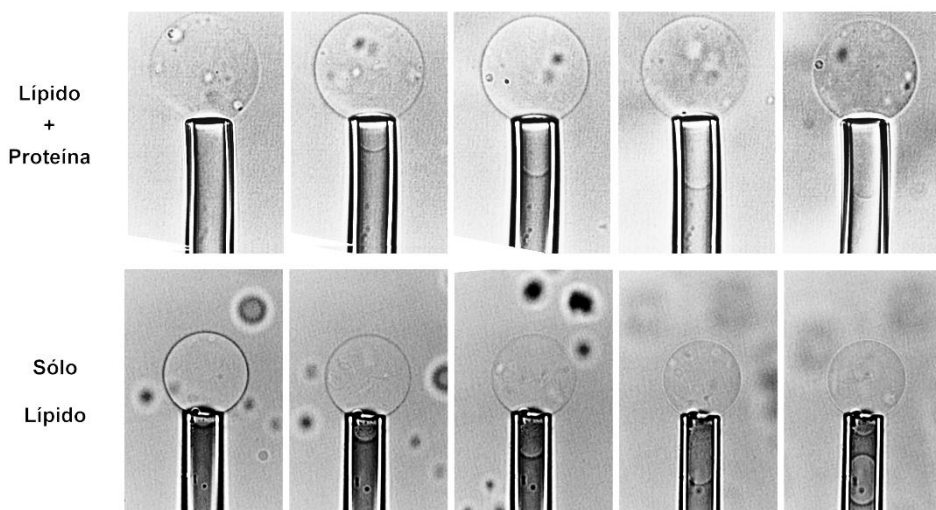


Fig. 11. Experimentos de aspiración con pipetas para dos vesículas de composición diferente, fila superior, vesículas con la proteína p10 insertada en la membrana, fila inferior, vesículas compuestas únicamente por lípido.

La membrana de las vesículas compuestas únicamente por lípido sufren mayor grado de tensión que las membranas con p10, lo cual se hace más evidente a estiramientos más grandes, tal y como parecía intuirse durante la realización de los experimentos. La segunda conclusión interesante concierne a los módulos de curvatura, cuyo valor se puede calcular a partir de la pendiente de la representación en Fig. 12, utilizando la expresión $kT \ 8\pi\kappa/K_B T$ propuesta por Evans *et al* [10]. Para el caso de la membrana lipídica, en ausencia de proteína, se obtiene un valor $\kappa = 6.3 \pm 3.7 k_B T$, valor superior al medido tras la incorporación de la proteína en la membrana, $\kappa = 1.7 \pm 1.4 \ k_B T$. La rigidez de curvatura de la membrana lipídica estudiada adopta valores significativamente más bajos que los conocidos para una membrana únicamente compuesta de DOPC ($kDOPC = 20 k_B T$), lo cual da idea del papel reblandecedor de los lípidos cargados y los lípidos oxidados incluidos en la presente formulación. En efecto, la carga a nivel de la cabeza polar produce una fuerte expansión de la membrana debida a la repulsión electrostática. Asimismo, la presencia de un grupo polar cargado en el extremo de una de las colas alifáticas produce tal disrupción entrópica que debería acompañarse de una gran disminución de la cohesión interna de la membrana, por tanto una fortísima disminución de los módulos elásticos.

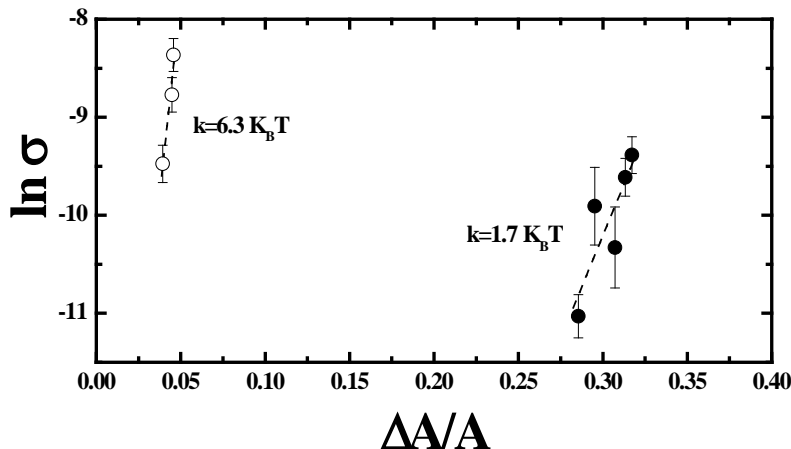


Fig. 12. (a) Representación $\ln(\text{tensión})$ -estiramiento para vesículas con (●) y sin proteína (○). Las líneas discontinuas evidencian el poco cambio en la pendiente entre la integración o no de p10, así como las diferencias de tensión existentes entre ambas.

4.5.2 Estudios de fluctuaciones de membrana.

Tal y como se ha comentado en el capítulo de introducción, la inserción de p10 en la membrana debe afectar a la permeabilidad del sistema a través de los flujos de transporte creados a lo largo de los canales abiertos. Adicionalmente, a nivel local la permeabilidad podría venir de alguna manera condicionada por la difusión lateral del poro en la membrana. Según la teoría inicialmente desarrollada por Manneville *et al* [8], la influencia mecánica de los eventos de permeación deberían poder ser observados en el espectro estático de fluctuaciones de acuerdo a las contribuciones impuestas por el campo local de permeación neta ϕ . Las contribuciones propuestas por Manneville *et al* al hamiltoniano de Canham-Herlfrich (3) incluyen una energía elástica debida a la fuerza neta involucrada en un evento simple de permeación y un término de acoplamiento que considera la influencia de la curvatura en la efectividad del poro. De acuerdo al modelo de Manneville, la amplitud de las fluctuaciones en el sistema, debería depender tanto de la concentración de canales incorporados a la membrana, como de la intensidad del flujo de material a través de los mismos.

$$dF[h, \phi] = \frac{1}{2} [\sigma(\nabla h)^2 + \kappa(\nabla^2 h)^2 + \chi(F_p)\phi^2 - 2w\Xi(\nabla^2 h)\phi] dA \quad (3)$$

El termino de permeabilidad neta se incorpora como una dependencia cuadratica ($\chi(F_p)\phi^2$), caracterizada por una susceptibilidad χ . El término de acoplamiento, caracterizado por una constante de acoplamiento Ξ , da idea del cierre o apertura del poro en función de la curvatura local de la membrana (Ec. 3 y 4), de tal modo que una protrusión de la membrana (curvatura positiva) favorece la apertura del poro y al contrario, una invaginación promueve el cierre. Teniendo en cuenta este funcional de energía libre elástica, asumiendo fluctuaciones en equilibrio, para la amplitud cuadrática de las mismas, el teorema de fluctuación-disipación establece una forma bimodal del espectro[8].

$$\langle h_q^2 \rangle \approx \frac{k_B T}{\sigma q^2 + \kappa_{eff}^{(\Xi)} q^4} + \frac{k_B T w^2 (\chi - \Xi/w)}{(\sigma + \kappa_{eff}^{(\chi)} q^2)(\sigma + \kappa_{eff}^{(\Xi)} q^2)} \quad (4)$$

En esta expresión del espectro de fluctuaciones de curvatura afectadas por la permeabilidad de la membranas encontramos en primer término la contribución usual de los modos de curvatura a la amplitud de las fluctuaciones térmicas. No obstante, en este caso se debe remarcar que la rigidez de curvatura se encuentra modificada por el valor de la constante de acoplamiento Ξ , en modo tal que un acoplamiento positivo (apertura del poro favorecida por curvatura positiva). El segundo término da cuenta de una amplitud adicional para el modo de curvatura/tensión, cuya amplitud se ve ahora amplificada debido a la fuerza de los eventos de permeación en términos globales descritos por la susceptibilidad χ . En este caso, el modulo de rigidez a su vez se encuentra modificado por el término neto de permeación.

En el caso de una membrana flexible ($\kappa \ll 20k_B T$), tal como es el caso aquí considerado, la presencia de poros que aumentan la permeabilidad de forma significativa contribuye en la práctica a una disminución efectiva del modo de rigidez, de tal manera que la membrana se reblandece de forma efectiva tanto mas, cuanto mayor permeabilidad presenta ($\kappa^\Xi, \kappa^\Pi \ll \kappa$). Adicionalmente, en vesículas altamente tensionadas $\sigma \gg \kappa q^2$, el espectro de fluctuaciones debería adoptar la forma simplificada:

$$\langle h_q^2 \rangle \approx \frac{k_B T}{\sigma q^2 + \kappa_{eff}^{(\Xi)} q^4} + \langle h_p^2 \rangle \quad (5)$$

donde el término de permeabilidad,

$$\langle h_p^2 \rangle \approx \frac{k_B T w^2 (\chi - \varepsilon / w)}{\sigma^2} \quad (6)$$

debería ser una contribución constante a las fluctuaciones, la cual debería emerger como una cola estable en el espectro a valores altos del vector de onda. La Ec. 5 establece una clara influencia de la permeabilidad sobre las fluctuaciones de curvatura a altos vectores de onda, de tal modo que una elevada permeabilidad (caracterizada por un valor elevado de la susceptibilidad χ) en una membrana con tensión relativamente baja debería contribuir a la aparición de fluctuaciones amplificadas a altos valores del vector de onda, donde la alta curvatura involucrada en las fluctuaciones está naturalmente penalizada.

En base a lo esperado por la teoría y al conocimiento de la dependencia de la integración en función del ratio Proteína/Lípido (observado en los experimentos de caracterización mediante Microscopía de Fuerzas Atómicas), se realizaron estudios de fluctuaciones mecánicas en vesículas compuestas únicamente de lípido frente a vesículas con proteína p10 integrada modificando los respectivos ratios de integración a 1/37000; 1:15000 y 1/7500.

En la figura 13 (A) se muestra el espectro de fluctuaciones para los diferentes casos, donde el ratio de integración se ha transformado en variable de concentración de proteína, ρ , la cual indica la densidad de poros por unidad de área de la membrana. En esta figura se observa que a bajos q 's (zona dominada por el régimen de tensión), la amplitud de las fluctuaciones para las muestras con p10 tiene un incremento de 2 órdenes de magnitud frente a las vesículas control compuestas únicamente por lípido, lo cual confirma los indicios de disminución de tensión observados en los experimentos de micropipetas. El análisis detallado de los espectros experimentales en términos del espectro en Ec. (6) indica la clara dependencia de la tensión de la membrana con la densidad de poro en la membrana. Los datos de la Fig. 13(C) ponen de manifiesto un marcado descenso de σ con la densidad de poros. En otras palabras, una pequeña cantidad de proteína produce un fuerte destensionado de la membrana.

En la zona de valores de q intermedios (zona dominada por la curvatura), se observa que la integración de la proteína produce una cierta influencia en el espectro, lo cual da idea de la dependencia del módulo de curvatura con la presencia de proteína. Como valor de referencia, se ha obtenido $\kappa_{ip} = (7 \pm 3) k_B T$ (st. dev. $N = 20$ vesicles) para la membrana base lipídica en ausencia de proteína, y un valor $\kappa_{prot} = (2 \pm 2) k_B T$ ($N = 15$ vesicles) para las membranas perforadas en presencia de proteína. Esta sensible disminución de la rigidez del sistema como resultado de la presencia de proteína es compatible con el reblandecimiento detectado de los datos de aspiración con

micropipeta (Veáse Fig.12). Por último, a altos q 's (zona dominada por la permeabilidad), el espectro muestra un plateau cuyo nivel es fuertemente dependiente de la concentración de proteína. El ajuste de los espectros experimentales a la Ec. 4 permite el ajuste de las colas espectrales elevadas a altos q 's, una consecuencia de la existencia de transporte permeativo que amplifica las fluctuaciones a altos vectores de onda. A partir de los resultados experimentales, en la Fig.13(D) aparecen representados los valores efectivos de la susceptibilidad de permeación referida a la densidad de poros, esto es la variable $(\chi - \Xi/n)/\rho$. Dentro del error experimental no se observa dependencia definida con la densidad de poros, la susceptibilidad permeativa de cada poro tomando un valor esencialmente constante del orden de $\chi_{\square}/\rho \approx 15 k_B T$. Se trata de un valor razonable, teniendo en cuenta el gran tamaño del poro considerado en relacion con canales convencionales, para los que dicha susceptibilidad se espera en un valor del orden de unos pocos $k_B T$.

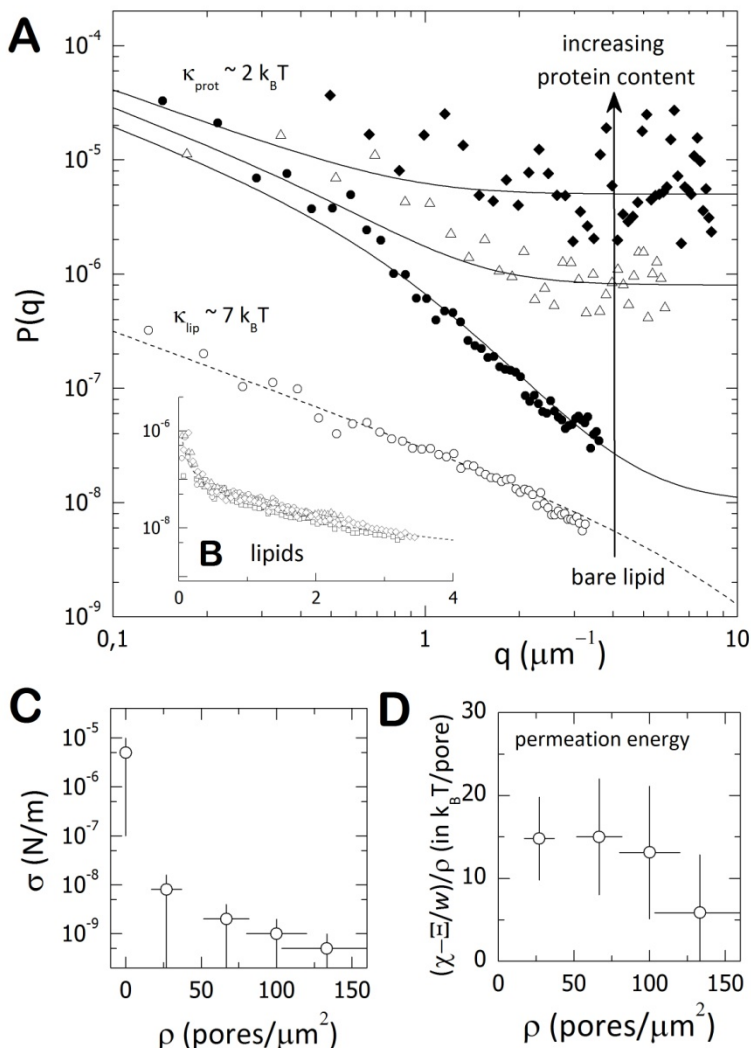


Fig. 13 (A) Espectro de fluctuaciones para vesículas compuestas únicamente por lípido (\circ), y vesículas con diferente concentración de p10 (ratios P/L: 1:37000, 1:15000 y 1:7500). (B) Espectro de fluctuaciones para varias vesículas control compuestas únicamente por lípido. (C) Dependencia de la tensión con la densidad de poros en la membrana. (D) Susceptibilidad de permeación en función de la densidad de poros.

El aumento significativo de las fluctuaciones debido a la permeabilidad a través de los poros, y las menores diferencias encontradas en el regimen dominado por tensión sugiere que el aumento de la permeación a través de la membrana influye en las regiones del espectro dominadas por las fluctuaciones de curvatura, dominio en el que producen una disminución efectiva de la rigidez de curvatura.

Por otro lado, la drástica disminución de la tensión de la membrana seguida a la incorporación de la proteína sugiere la existencia de un importante impacto estructural en la integración del poro en la membrana. Desde el punto de vista de la proteína, el poro integrado no es una entidad monolítica, más bien un objeto oligomérico con un elevado grado de plasticidad conformacional en su estructura terciaria, una movilidad conseguida a través de la labilidad de las interacciones no-covalentes entre los diferentes monómeros y que dan lugar al ensamblaje del conector. Si se asume que cada monómero está fuertemente ligado al core hidrofóbico de la membrana a través de una o varias uniones covalentes mediadas por los lípidos funcionales, en tal caso, la dilatación lateral de la membrana estará fuertemente condicionada a la presencia de poros con una conformación extensible. Este sería a su vez el mecanismo estructural por el que el poro podría acoplar fuertemente su apertura con el estado tensional o de curvatura de la membrana, de forma mecánicamente similar a los canales mecanosensibles de las bacterias [8].

4.5.3 Consecuencias de la incorporación de p10 en la dinámica de las fluctuaciones membrana.

Una vez observado el efecto de la incorporación de p10 en el espectro estático de fluctuaciones, se obtuvieron las funciones de autocorrelación dinámicas para observar el impacto de la incorporación de p10 en las frecuencias de relajación del sistema. Para ello, se analizaron las funciones de autocorrelación dinámicas para vesículas control (lípidos) frente a vesículas con p10 inserto en la membrana (ratio 1:37000). En la figura 14 se muestran las funciones de autocorrelación correspondientes a los 6 primeros modos en cada caso, donde se observa cómo la presencia de p10 en la membrana parece indicar que la relajación de las funciones de autocorrelación ocurre en tiempos más cortos, lo cual indica que la dinámica del sistema, en general, se vuelve más rápida.

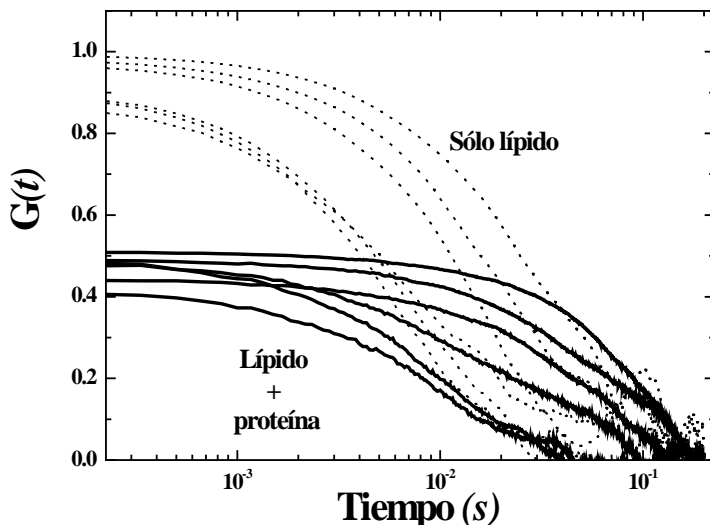


Fig. 14. Funciones de autocorrelación para vesículas en presencia y en ausencia de p10. (Sólo se muestran los 6 primeros modos)

La relajación de las funciones de autocorrelación para cada modo se ajustó a una exponencial simple según lo esperado para una bicapa fluida en la que no existen fuerzas de disipación debidas al rozamiento de una monocapa con otra dentro de la bicapa lipídica (modo híbrido). Una vez obtenidas las frecuencias de relajación características para cada modo, se estudió la dispersión de las mismas en función del vector de onda (q).

La dispersión de frecuencias para el caso de las vesículas control (lípido) sigue una tendencia acorde con las predicciones teóricas esperadas para una vesícula con sus características (ver Figura 15) según:

$$\Gamma = \kappa q^3 + \sigma q / 4\eta \quad (7)$$

Observándose dominancia a valores de q bajos de la tensión frente dominancia de la curvatura a valores q mayores para el rango de q 's observables en este tipo de técnica.

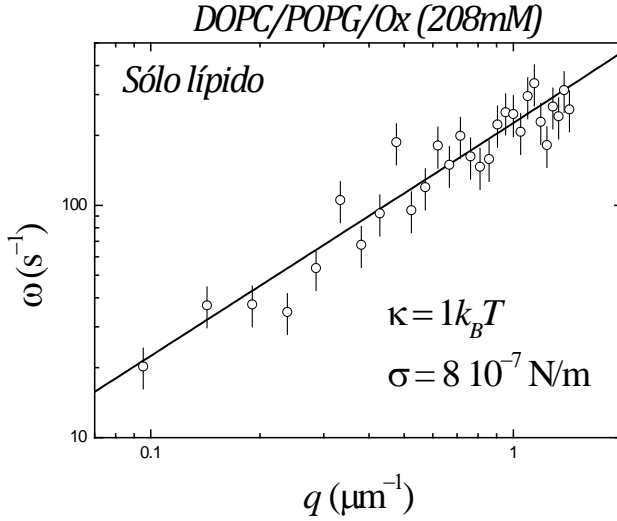


Fig. 15. Dispersión de frecuencias de relajación en función del vector de onda para una vesícula típica compuesta únicamente por lípido.

Para el caso de las vesículas con presencia de p10 en la membrana, la dispersión de las frecuencias de relajación sufre desviaciones respecto de las predicciones teóricas esperadas para vesículas compuestas únicamente por lípidos. Estas desviaciones corresponden a valores de q altos, donde el módulo de curvatura debería estar dominando, pero variaciones significativas en el mismo no son capaces de describir las desviaciones observadas en la dispersión; sin embargo, cuando en los ajustes se tuvo en cuenta la influencia de una fuerza de permeación (Ec. 8), además de las existentes en estos rangos de tensión y curvatura, la descripción de estas desviaciones mejoró significativamente.

$$\Gamma = \left(\lambda + \frac{1}{4\eta q} \right) (\sigma q^2 + \kappa_{eff}^{\Xi} q^4) \quad (8)$$

En la figura 16 se muestra la dispersión obtenida para una vesícula con presencia de p10 en su membrana, en la cual se observan las desviaciones comentadas en el párrafo anterior. En ella, se muestra cuál sería la tendencia de la dispersión de las frecuencias de relajación (línea punteada) sin tener en cuenta los efectos de la permeabilidad, mientras que cuando se tienen en cuenta los términos de permeabilidad (línea continua), se observa cómo la descripción de esta desviación mejora significativamente.

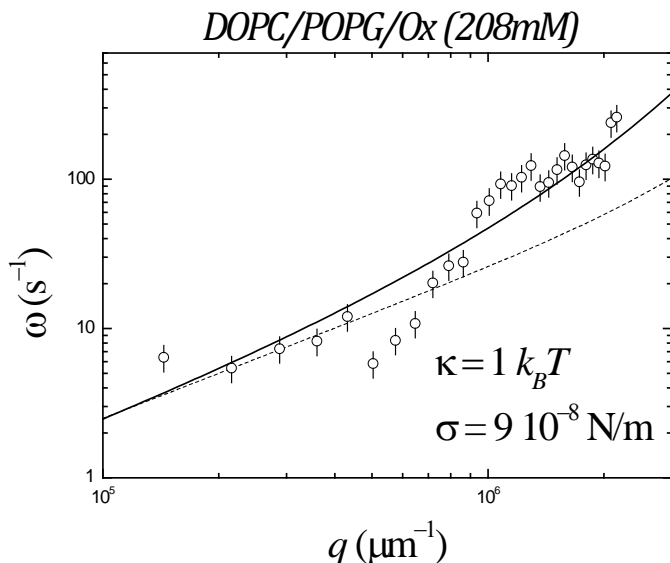


Fig. 16 Dispersión de frecuencias de relajación en función del vector de onda para una vesícula típica conteniendo p10.

Otro efecto observado en estos análisis que está en concordancia con los observados en los análisis anteriores, tanto en micropipetas como en el espectro de fluctuaciones, es la disminución de los valores de tensión obtenidos para cada situación.

4.5.4 Permeabilidad microscópica: estudio por NSE a altos vectores de onda

Una vez comprobada la emergencia de modos de curvatura controlados por el transporte permeativo a altos vectores de onda, cabe preguntarse sobre la posibilidad de detectar la velocidad de permeación de un poro único detectando las fluctuaciones de permeabilidad sobre pequeñas distancias comparables con el tamaño del poro. Con este propósito, se han realizado experimentos de NSE sobre vesículas conteniendo una cantidad considerable de proteína p10 integrada en la membrana en forma de poro de alta permeabilidad. En la Figura 17 se presentan los datos correspondientes a estos experimentos, en los que se comparan funciones de relajación intermedia para dos concentraciones de proteína frente al control de la vesícula lipídica en ausencia de poro. Los datos experimentales están afectados de un gran error, lo que limita el

análisis a un estudio semicuantitativo comparando los datos con las funciones teóricas esperadas en el caso permeativo y no permeativo.

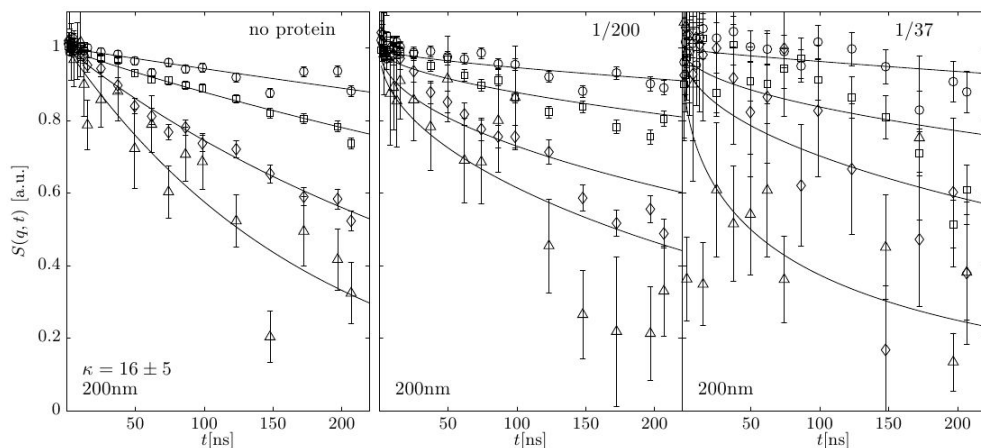


Fig. 17. Funciones de relajación intermedia para dos concentraciones de proteína frente al control de la vesícula lipídica en ausencia de poro.

De este análisis, se deduce que existe un incremento notable de permeabilidad de membrana desde el caso no permeable (en ausencia de proteína) hasta los casos con cantidades crecientes de poro integrado.

4.5.5 Estudios de permeabilidad en gradientes osmóticos

Espectro estático de fluctuaciones

Una vez comprobada la importancia de la permeabilidad a través de los poros en la mecánica de la membrana, se hicieron estudios a diferentes gradientes osmóticos para forzar el incremento del flujo de moléculas a través del mismo. Hasta el momento, todos los ensayos realizados se encontraban en gradientes osmóticos dentro-fuera de la vesícula aproximadamente equiosmolares (200-208 mM de sacarosa-glucosa), pero en estos experimentos, diferentes muestras de vesículas a un ratio proteína/lípido de 1/37000 fueron sometidos a diferencias osmolares de 8 mM, 80 mM y 400 mM.

Según la teoría de permeabilidad introducida por Manneville *et al* [8], en el hamiltoniano de Canham-Helfrich, el término de permeación de la membrana está directamente relacionado con el paso de moléculas a través del canal y con el número de canales encontrados en la membrana ($\chi(F_p)\phi^2$), de este modo, un forma de comprobar que los efectos de ablandamiento y disminución de la tensión que se observan en los experimentos son consecuencia de la permeabilidad causada por los canales del conector p10.

En los resultados obtenidos en estas experimentos (ver Figura 18), los espectros estáticos de fluctuaciones fueron bastante similares a los obtenidos cuando se estudiaba el incremento de canales en la membrana, observándose cómo a mayores diferencias osmóticas entre el interior y el exterior de las vesículas, la amplitud de las fluctuaciones en el rango de q 's afectado de forma significativa por el efecto de la permeabilidad sigue estando incrementada, al igual que la zona dominada por el regimen de tensión, en la cual se siguen encontrando diferencias en la amplitud de 2 órdenes de magnitud, explicables unicamente como el aumento de estas alturas como consecuencia de una disminución en la tensión de la membrana.

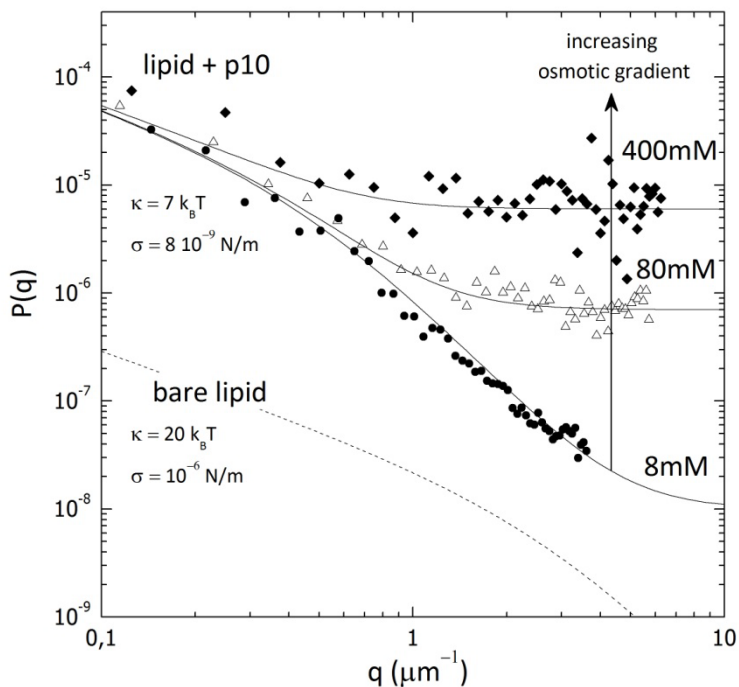


Fig. 18. Espectro de fluctuaciones para vesículas con p10 a un ratio P/L 1/37000 expuestas a diferentes gradientes osmóticos (8 mM, 80 mM y 400 mM).

Dinámica de fluctuaciones (Funciones de autocorrelación dinámicas).

Al igual que en el apartado anterior, se extrajeron las funciones de autocorrelación dinámicas para el estudio de las fuerzas implicadas en la disipación de las energías de curvatura en el tiempo. En concordancia con los resultados obtenidos en el espectro estático de fluctuaciones, la dispersión de las frecuencias de relajación sigue contemplando una desviación de las predicciones teorías en ausencia de permeabilidad.

Al igual que en los resultados para el espectro estático, el incremento del gradiente osmótico es traducido como un aumento de la desviación de las frecuencias a valores de q altos. Por lo que se confirma que el aumento del flujo a través de los canales o el aumento de los mismos en las membranas tiene una fuerte repercusión en este rango de q 's.

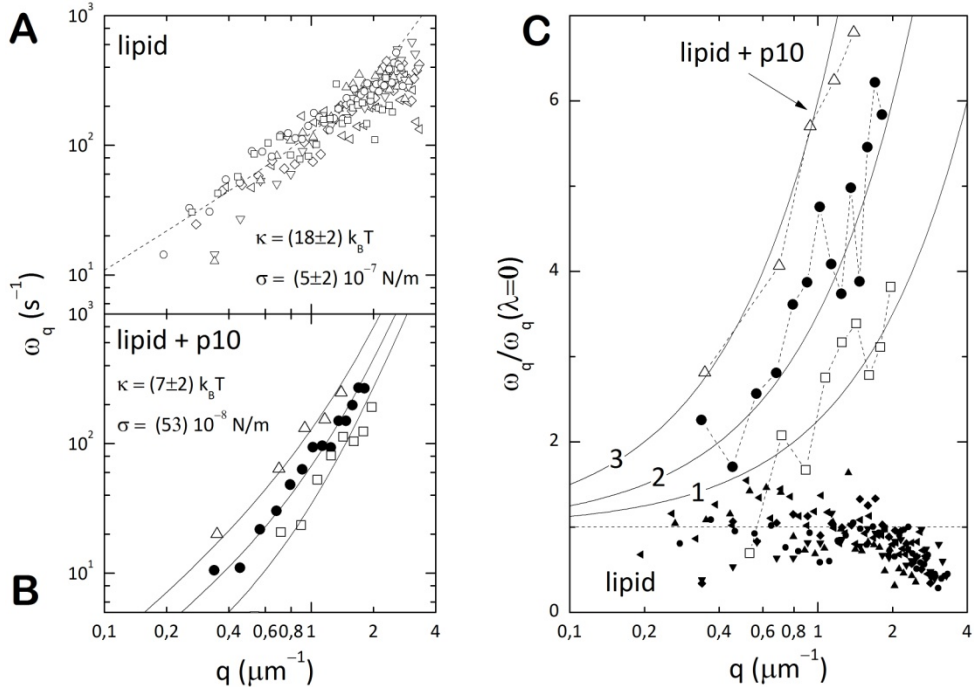


Fig. 19. Funciones de autocorrelación dinámica para vesículas con p10 a un ratio P/L 1/37000 expuestas a diferentes gradientes osmóticos (8 mM, 80 mM y 400 mM).

En la figura 19 se muestran las dispersiones de las frecuencias de relajación correspondientes a los experimentos comentados en el párrafo anterior. En la figura (A), se muestra cómo las dispersiones que se obtienen para vesículas con ausencia de p10 no sufren desviación alguna a altos q 's como consecuencia de un aumento de la permeabilidad al agua a través de la membrana causado por gradientes osmóticos.

En la figura (B), sin embargo, se observan los resultados obtenidos del análisis de las funciones de autocorrelación extraídas para las mismas vesículas empleadas en la figura 18. Como puede observarse, el aumento en la altura de las fluctuaciones observadas a valores de q altos corresponde al aumento de las desviaciones observadas en la dispersión de frecuencias para sus mismas funciones de autocorrelación. En la figura (C), se muestra la dispersión de las frecuencias de relajación de los casos (A) y (B) corrigiendo la tendencia de los mismos con la tendencia teórica esperada en ausencia de permeabilidad (reduciendo las tendencias debidas a las fuerzas de tensión y curvatura de estas vesículas). Como se observa, para el caso de las vesículas en ausencia de proteína (\blacktriangle), la reducción de estos términos convierte la tendencia de esta dispersión en una tendencia prácticamente nula, lo cual confirma la ausencia de efectos de permeabilidad en creados por la posible apertura de poros en la membrana debidos al gradiente, etc. Sin embargo, para el caso de las vesículas con p10, el efecto de la permeabilidad es observado con mayor claridad.

4.6 Integración del resto de los componentes

Una vez estudiados los efectos dinámicos de la integración de p10 en la membrana, se decidió intentar poner el motor de empaquetamiento en funcionamiento. Debido al espesor de la membrana de DOPC adaptada con lípidos oxidados y cargados, 4 nm, se decidió intentar reducir el espesor de la misma con la intención de crear mayor superficie de acceso en la superficie de p10 para mejorar el ensamblaje del resto de los componentes (pRNA y gp16) alrededor del conector p10.

El lípido neutro DOPC contiene una longitud de cadena de 18 carbonos, por lo que se escogió un lípido de menor longitud de cadena, DMPC (14 carbonos).

Asimismo, la reología de membranas compuestas por DMPC es bastante conocida en nuestro grupo, ya que ha sido bien caracterizada en nuestro grupo mediante NSE y técnicas de análisis de fluctuaciones (resultados no publicados), además, su módulo de curvatura es bastante similar al del DOPC $\approx 20 \text{ K}_B\text{T}$, por lo que la eficacia de inserción de p10 no debería verse alterada aparentemente por el cambio de la misma.

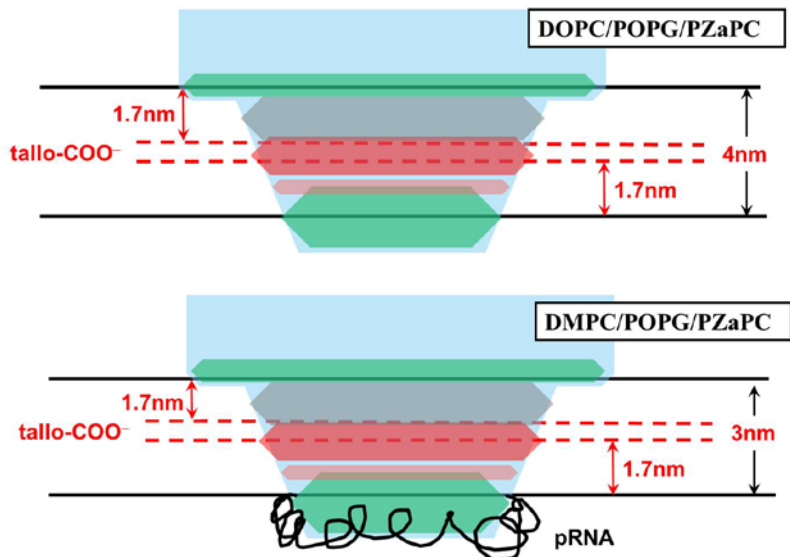


Fig. 20. Esquema del complejo p10-bicapa lipídica esperado para las membranas conteniendo como lípido mayoritario DOPC (Imagen superior) e esquema esperado para el complejo p10-bicapa lipídica con el resto de moléculas de empaquetamiento para las membranas conteniendo DMPC.

Para caracterizar la inserción del conector p10 en la membrana, se caracterizaron liposomas realizados siguiendo la misma metodología empleada hasta el momento por Microscopía de Transmisión Electrónica de Crio fractura.

En la figura 20, se muestran dos imágenes en las cuales se observa la presencia de la misma en la membrana. En la imagen superior, en la zona resaltada por un círculo rojo, se evidencia un corte perpendicular de uno de los canales conformados por el complejo proteico p10 mientras que en la inferior parece evidenciarse uno de los conectores p10 con cierto ángulo respecto del plano transversal.

Mediante estos estudios, se confirma que la inserción de p10 en la membrana sigue ocurriendo en condiciones favorables de inserción y ortogonalidad como cabía esperar al seguir conteniendo POPG y PAzPC. Por lo que los resultados presentados en las siguientes páginas estarán referidos a membranas con la siguiente composición lipídica:

Lípido	Porcentaje (w/w)	función
DMPC (cabeza zwiterionica)	80%	Estructural
PazPC (ox-PC) (cola funcional)	10%	Ensamblaje ecuatorial covalente
POPG (cabeza aniónica)	10%	Ensamblaje superficial electrostático

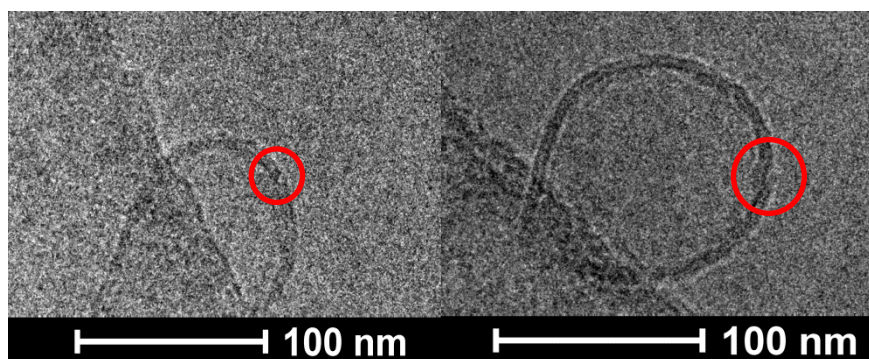


Fig. 21. Imágenes de Criomicroscopía Electrónica de Transmisión de liposomas compuestos por DMPC/PAzPC/POPG/p10. Los círculos rojos evidencian la presencia de conectores en la membrana.

La puesta en funcionamiento de la maquinaria de empaquetamiento de *phi29* en vesículas gigantes se intentará evidenciar a través de cambios en la mecánica del sistema.

4.6.1 Estudio de fluctuaciones de membrana de vesículas de DMPC/POPG/PAzPC en presencia de p10 y pRNA.

Una vez estudiados los efectos mecánicos más significativos de la inserción de p10 en una membrana y la caracterización de la presencia del mismo en una membrana de menor espesor, se intentó caracterizar la inserción del resto de las piezas de la maquinaria de empaquetado. Para ello, las vesículas con la nueva membrana de menor espesor, fueron incubadas en presencia de pRNA (según la metodología detallada en el capítulo de materiales y métodos) para observar las influencias de la presencia del mismo en la mecánica de la membrana. Desde un punto de vista de permeabilidad, la presencia de esta nueva pieza no debería afectar significativamente al paso de material, ya que su ensamblaje debería realizarse externamente a la membrana.

A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos en la mecánica acerca de la membrana cuando las vesículas en presencia de p10 se ponían en contacto con la pieza de pRNA.

En cuanto al espectro estático de fluctuaciones, la inserción de pRNA no mostró diferencias significativas con respecto a la situación de p10 en la membrana. Sigue observándose un descenso aparente de la tensión de la membrana junto con un aumento de la amplitud de las fluctuaciones en la zona afectada por la permeabilidad. En la Figura 22 se muestra un espectro estático de fluctuaciones con las diferentes situaciones experimentales estudiadas donde se aprecia el descenso de la tensión de un orden de magnitud y el aumento de la permeabilidad cuando el pRNA está presente en el experimento, lo cual está en acuerdo con los resultados observados hasta el momento para vesículas en presencia de la proteína p10 cuyo lípido composicionalmente mayoritario era DOPC.

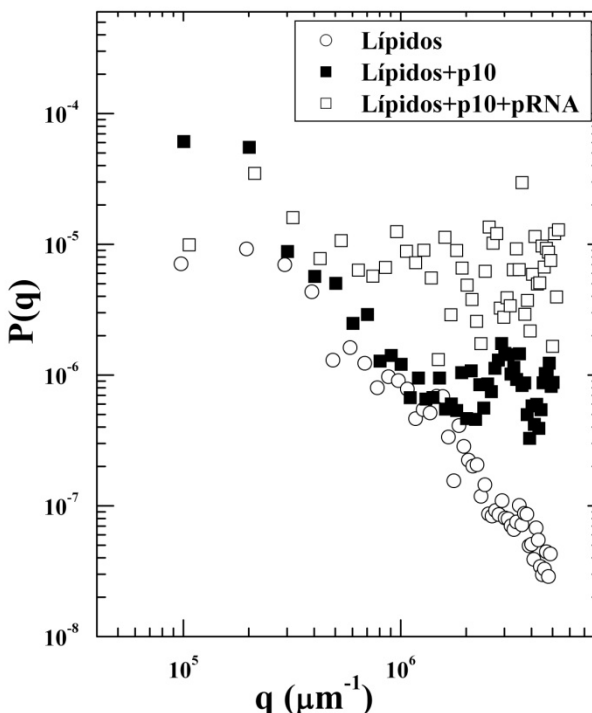


Fig. 22. Espectro de fluctuaciones para vesículas compuestas por DMPC/POPG/PZaPC (○), en presencia de p10 (■) y en presencia de p10 y pRNA (□).

4.6.2 Estudio de la dinámica de fluctuaciones de vesículas de DMPC/POPG/PAzPC en presencia de p10 y pRNA.

El estudio de las funciones de autocorrelación para el sistema anterior, al igual que en la membrana compuesta principalmente por DOPC, parece indicar un aumento de la relajación debido a un mayor efecto de las fuerzas disipativas. La presencia de la proteína p10 en la membrana promueve que la dinámica de fluctuaciones se vuelva más rápida, al igual que el ensamblaje del pRNA, el cual parece aumentar aún más la dinámica, observándose las funciones de autocorrelación en la escala de tiempos accesible en los experimentos prácticamente relajadas.

En la Figura 23, se muestran las funciones de autocorrelación típicas obtenidas para cada caso, donde puede apreciarse cómo la escala de tiempo accesible experimentalmente imposibilita el acceso para el estudio de las mismas cuando la molécula de pRNA está presente en la muestra.

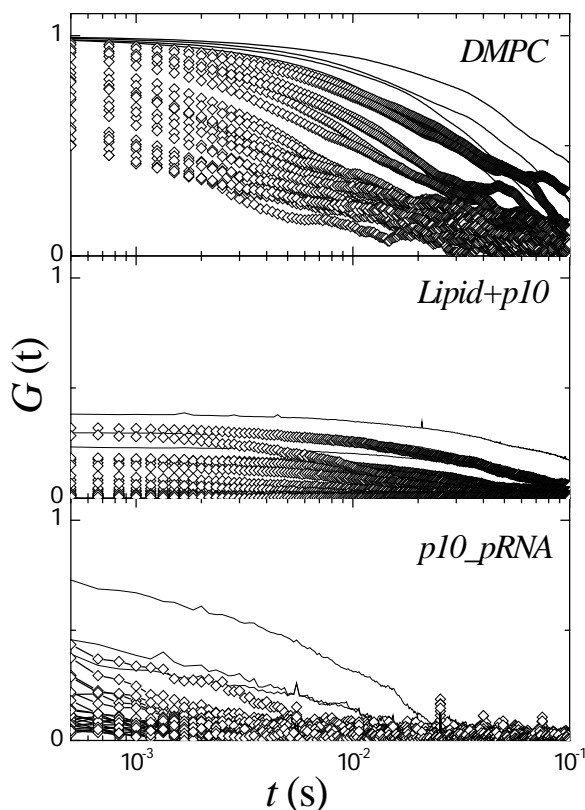


Fig. 23. Función de autocorrelación de una vesícula de DMPC, una vesícula de DMPC/POPG/PAzPC en presencia de *p10* y una vesícula de DMPC/POPG/PAzPC en presencia de *p10* y *pRNA*.

El aumento de permeabilidad observado en los espectros estáticos de fluctuaciones, junto el aumento de las frecuencias de relajación observado en las funciones de autocorrelación, pueden indicar que la molécula de *pRNA* está interaccionando con la proteína *p10*, y que pueden estar sucediendo eventos en la membrana que promueven el aumento de las fluctuaciones. Una de las causas por las que se pueden estar observando estos hechos puede ser debido a la alta interacción de la molécula de *pRNA* con *p10*. La molécula de *pRNA* puede estar generando fuerzas de atracción hacia la proteína *p10* insertada en la membrana induciendo su salida al exterior de la membrana para ensamblarse de forma adecuada, lo cual podría estar justificado por el aumento de la permeabilidad observado en el espectro estático de fluctuaciones.

Otro de los mecanismos que podría estar observándose, podría ser que las moléculas de pRNA interaccionen inespecíficamente con la membrana provocando algún tipo de evento externo en la membrana que genere intercambio de material entre los distintos compartimentos de la membrana (dentro-fuera o viceversa); pero el acceso al estudio de las fuerzas implicadas en el aumento de la relajación de las funciones de autocorrelación no es accesible a través de los parámetros experimentales utilizados en estos experimentos. Ante estas conclusiones, para poder realizar el estudio de la dinámica del proceso, se hizo necesario el desplazamiento de las funciones de correlación a la escala de tiempos accesible experimentalmente por la ventana de observación.

La reducción de la velocidad de relajación de las funciones de autocorrelación experimentales, según la teoría, puede realizarse de dos modos, el primero de ellos es el aumento de la velocidad de adquisición de las películas, disminuyendo el tiempo de integración; mientras que el segundo puede realizarse teniendo en cuenta la ecuación del movimiento para un fluido incompresible en ausencia de fuerzas inerciales (De donde es obtenida la expresión para la extracción de las funciones de autocorrelación) (ec. 9):

$$\langle \zeta(q, t), \zeta(q', t') \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} \exp(-\Gamma t) \quad (9)$$

Las funciones de autocorrelación son dependientes de una frecuencia de relajación tal que:

$$\Gamma = \frac{\kappa q^3 + \sigma q}{4\eta} \quad (10)$$

Donde puede observarse que la dependencia con las características intrínsecas de la membrana (curvatura, tensión) y con la viscosidad del medio.

Por ello, con la intención de desplazar las frecuencias de relajación observadas al añadir la molécula de pRNA y poder estudiar en mayor profundidad los efectos del ensamblaje del resto de la maquinaria de ensamblamiento, se hicieron estudios de las funciones de autocorrelación para una membrana modelo constituido únicamente por DMPC.

4.6.3 Estudios de la dependencia de la dinámica de las fluctuaciones en función de la viscosidad para vesículas de DMPC.

La dinámica de las vesículas constituidas por DMPC (lípidos mayoritarios en la membrana de menor espesor) ha sido estudiada en profundidad en nuestro grupo; Este lípido se ha utilizado como modelo de membrana para evidenciar las fuerzas de fricción disipativas (rozamiento entre monocapas) involucradas en la relajación de las fluctuaciones mediante experimentos tanto en NSE como en técnicas de análisis de fluctuaciones (*resultados no publicados*).

Según la teoría introducida por Seifert *et al* [11] descrita en el apartado 2.2.5 del capítulo de Introducción, la relajación de las funciones de autocorrelación depende directamente de la viscosidad del medio junto las fuerzas motrices intrínsecas involucradas en la disipación de la energía de curvatura (modo híbrido y modo de flexión). En función del rango de q 's donde nos encontremos, puede estudiarse la dominancia de un modo o de otro en la relajación de la fluctuación, por lo que en las condiciones estudiadas hasta el momento en este trabajo, en el rango de q 's donde nos encontramos, debe existir una dominancia del modo de flexión sobre el modo híbrido debido a que la redistribución lateral de los lípidos se hace más lenta.

En base a conocer la dominancia de un modo u otro al ralentizar la relajación de las funciones de autocorrelación, se hicieron estudios con este lípido variando la viscosidad del medio. Las viscosidades utilizadas de sacarosa/glucosa fueron 200 mM, 2 M y 4 M.

Cuando se observaron las funciones de autocorrelación para los diferentes casos, pudo confirmarse que el aumento de la viscosidad del medio, desplaza las frecuencias de relajación a tiempos más largos tal y como predice la teoría desarrollada por Seifert *et al*. En la Figura 24, se muestran las funciones de autocorrelación típicas obtenidas para una vesícula en cada caso de viscosidad creciente, donde puede observarse claramente el desplazamiento de la relajación de las mismas, junto con la aparición de un segundo modo disipativo (híbrido) debido al desplazamiento de una monocapa sobre la otra. La presencia de este segundo modo de relajación sobretodo se aprecia en esta figura en el caso de la vesícula de viscosidad 4 M, donde la función de autocorrelación deja de relajarse en base a una exponencial a tiempos más largos, por lo que claramente, la relajación no está debida únicamente a los modos de flexión.

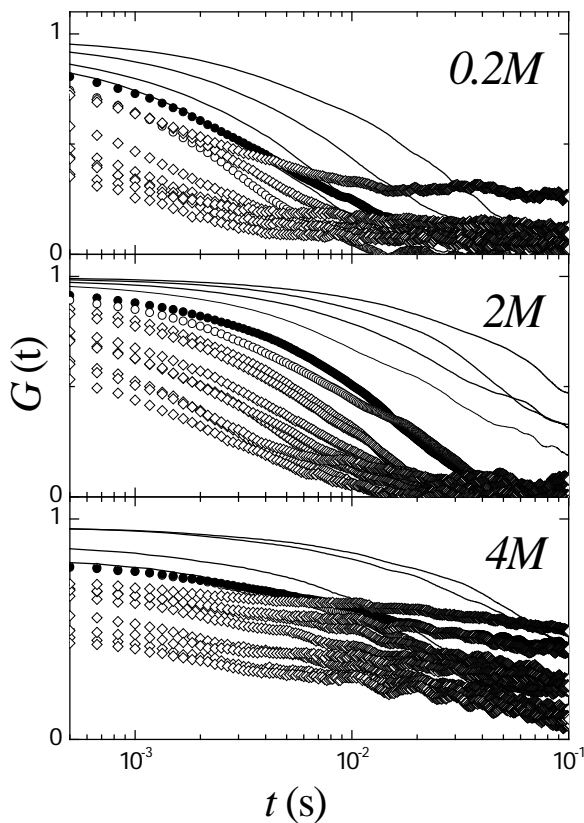


Fig. 24. Funciones de autocorrelación para tres vesículas compuestas por DMPC en medios de diferente viscosidad (200 mM, 2M y 4M).

El análisis de las funciones de autocorrelación correspondientes a estos experimentos se realizó ajustando las funciones a dos exponenciales para obtener las dos frecuencias de relajación, sin embargo, debido a la cercanía en la dispersión de frecuencias de ambos modos, en algunas ocasiones el análisis de las funciones de autocorrelación se volvió más tedioso; para evitar este problema, en el rango de q 's donde se realizan estos experimentos, puede predecirse la contribución del modo híbrido según $\Gamma_H = \kappa/4\eta q^3$, por lo que durante el análisis de las funciones, se intentó que las frecuencias del mismo fuesen razonables.

En la figura 25, se muestra la dispersión de las frecuencias obtenidas tras los análisis de las vesículas referidas en la figura 24. Puede observarse cómo a una viscosidad de 200 mM el modo clásico de flexión o hidrodinámico se encuentra dominando

significativamente sobre el modo híbrido, mientras que a viscosidades mayores, esta relación comienza a verse afectada llegando incluso a invertirse. Tal y como predice la el desarrollo de Seifert *et al*, el aumento de la viscosidad del medio influye considerablemente sobre las fuerzas hidrodinámicas involucradas en la generación de curvatura, mientras que, el transporte lateral de los lípidos no se ve tan afectado.

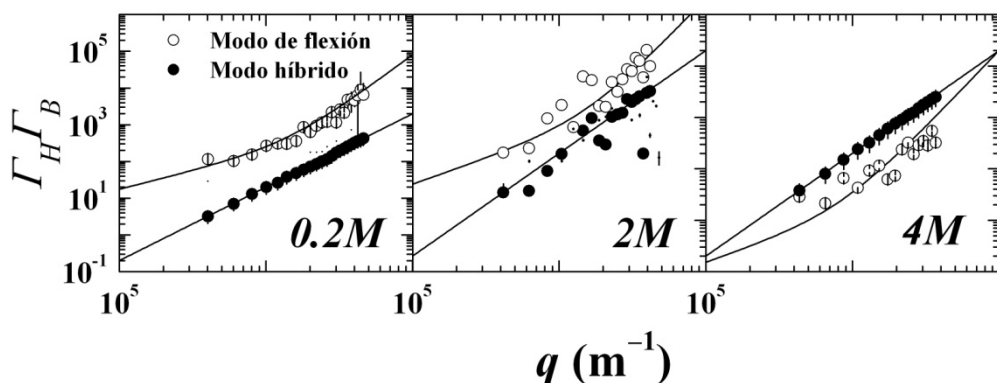


Fig. 25. Dispersión de frecuencias de relajación en función del vector de onda para vesículas de DMPC en medios externos de viscosidad variable (200mM, 2M y 4M).

En base a estos resultados, se decidió realizar el resto de los experimentos de ensamblaje en medios de viscosidad 2 M con la intención de poder realizar un mejor análisis de la dinámica de fluctuaciones.

4.6.4 Estudios de la dinámica de fluctuaciones en vesículas de DMPC/POPG/PAzPC a concentración 2M (sacarosa-glucosa) en presencia de p10.

Una vez estudiada la dinámica de fluctuaciones en vesículas modelo de DMPC en una viscosidad de sacarosa-glucosa 2M, se estudiaron los efectos de la permeabilidad al igual que en caso de la membrana compuesta principalmente por DOPC para comprobar si los efectos de la misma siguen siendo influyentes en la dinámica de fluctuaciones. Para ello, se utilizaron vesículas con la nueva membrana más estrecha (DMPC/POPG/PAzPC) tanto en ausencia como en presencia de la proteína p10.

Tal y como se muestra en la figura 26, las funciones de autocorrelación para el caso de las vesículas con presencia de p10 en sus membranas ya son accesibles en la ventana experimental, pudiéndose estudiar el efecto de las mismas. Para el caso de las

vesículas en ausencia de *p10*, la dispersión de frecuencias obtenida del análisis de las funciones de autocorrelación estaba en concordancia con lo observado en vesículas de DMPC en esa viscosidad, tal y como se muestra en la Figura 26.

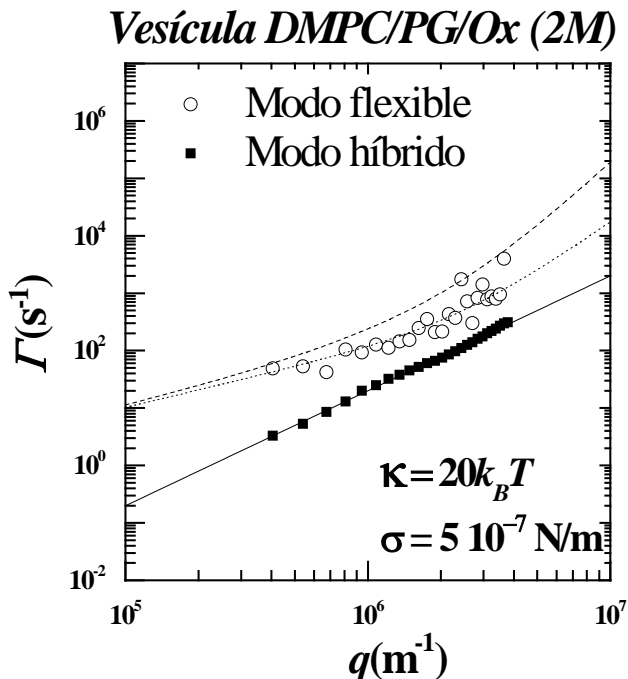


Fig. 26. Dispersión de las frecuencias obtenidas del análisis de las funciones de autocorrelación para una vesícula de DMPC/POPG/PAzPC a viscosidad 2M.

Asimismo, en el estudio de las funciones de autocorrelación para vesículas compuestas por la misma composición lipídica, pero en presencia de *p10* (ver Figura 27), se siguen observando desviaciones en el modo de curvatura o flexión en valores de q 's altos, lo cual está en acuerdo con el aumento de la permeabilidad a través de los poros conformados por *p10*.

En cuanto a los efectos sobre la tensión de membrana, de acuerdo con lo observado membranas compuestas por DOPC como lípido mayoritario, sigue observándose un descenso de la tensión cuando *p10* está presente en la membrana.

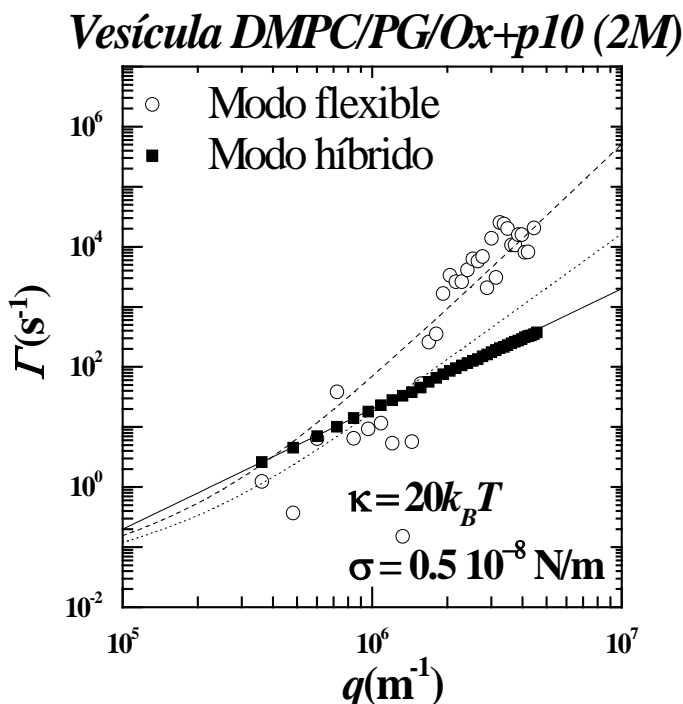


Fig. 27. Dispersión de las frecuencias obtenidas del análisis de las funciones de autocorrelación para una vesícula de DMPC/POPG/PAzPC en presencia de p10 a viscosidad 2M.

Otro resultado a resaltar en estos experimentos, es que la presencia de una mayor viscosidad en el medio no afecta significativamente el desplazamiento de material a través de los poros ya que siguen observándose desviaciones de la misma a valores de q altos.

4.6.5 Sistema completo: Fluctuaciones activas en presencia de la maquinaria completa con actividad ATP-asa.

Por último, y en el ánimo de completar el objetivo principal de esta tesis, se ha procedido al estudio de las fluctuaciones de forma de vesículas con la maquinaria de translocación completa, tanto en ausencia como en presencia de ATP, que provoque la actividad ATP-asa del ensamblaje activo de terminasas. En este caso, la presencia de permeación exacerbada se pone de manifiesto como una rápida pérdida de contraste óptico que a medio plazo imposibilita la observación de las fluctuaciones de la membrana y por tanto la obtención de propiedades estadísticamente promediadas, tales como el espectro o la función de auto correlación. Si ha sido posible el análisis de

las trayectorias o la obtención de la amplitud de las fluctuaciones sobre un periodo de tiempo inferior a los casos de equilibrio anteriormente considerados.

En primer lugar, en la Figura 28 se representan de forma comparativa las trayectorias del desplazamiento cuadrático medio acumulado de la membrana en los diferentes casos relevantes a este estudio.

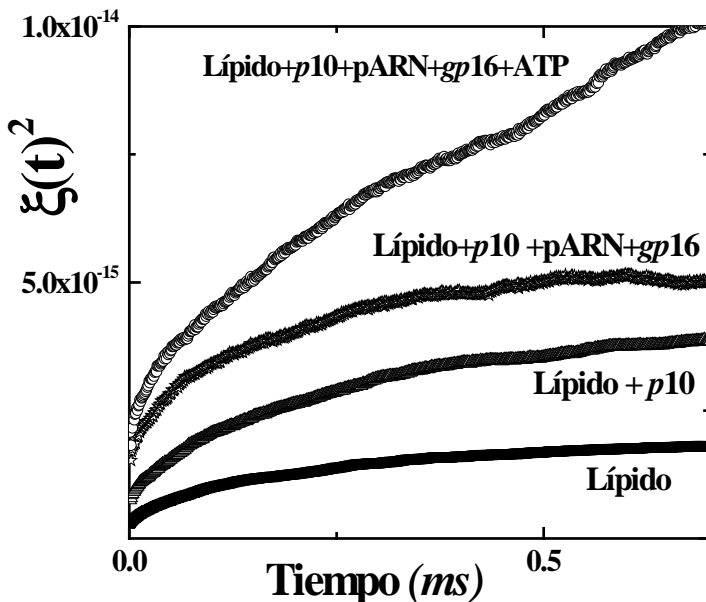


Fig. 28. Trayectorias del desplazamiento cuadrático medio acumulado en la membrana para vesículas compuestas únicamente por lípido, tras incorporación d p10, p10+pRNA+Terminasa, y p10+pRNA+Terminasa+ATP.

En primer lugar, observamos que la trayectoria correspondiente a las fluctuaciones térmicas de una membrana lipídica en ausencia de proteína es de tipo confinada, con un periodo difusivo inicial donde los desplazamientos crecen en forma $\xi^2(t) \sim Dt$, para rápidamente alcanzar un valor constante correspondiente al promedio gaussiano $\langle \xi^2(t) \rangle \sim k_B T / (\sigma q^2 + \kappa q^4)$. Es este *plateau* el que identifica la trayectoria como confinada, es decir, por mucho que avanza el tiempo, el desplazamiento neto de la membrana permanece en un valor constante correspondiente a la desviación estándar de las fluctuaciones de cada punto de la membrana alrededor de la posición promedio definida por la forma estática de la membrana. Una situación similar es observada en

presencia de proteína *p10* incorporada en la membrana. Sin embargo, en este caso la existencia de poros da lugar a la disminución de tensión anteriormente referida (véase Fig. 13 (C)) y produce un incremento de permeabilidad que da lugar a fluctuaciones evidentemente amplificadas (véase Fig. 13 (A)), lo que se traduce en un incremento del *plateau* terminal de la trayectoria correspondiente a este caso en la Fig. 29. Finalmente, la incorporación del pRNA y el oligómero de terminasa da lugar a la apertura funcional del poro, lo cual posibilita un mayor transporte a través de la membrana y a unas fluctuaciones aún más amplificadas. El primer efecto es visible en forma de difusión efectiva acelerada (aumento de la pendiente inicial), mientras que el segundo produce un incremento adicional en el *plateau* final correspondiente a la amplitud promediada de las fluctuaciones cuadráticas. Las leves oscilaciones a tiempos largos corresponden a desplazamientos del centro de masa de la vesícula (*translational drift*), movimiento indeseable que es particularmente detectable en las vesículas con toda la maquinaria montada, y que da lugar a las variaciones espurias observadas a tiempos superiores a 0.4 ms.

A diferencia de los casos anteriores, donde todas las trayectorias son observadas confinadas, la presencia de ATP, en cambio, produce una trayectoria absolutamente inusitada (Véase Fig. 28). No solamente aumenta de forma radical la velocidad del transporte de membrana (pendiente inicial difusiva), sino que la trayectoria torna claramente no confinada, es decir, los desplazamientos aumentan de forma monótona sin alcanzar un *plateau* de saturación a tiempos largo. Este comportamiento es claramente indicativo no solo de actividad fuera de equilibrio, sino de la presencia de grandes fluctuaciones que provocan un transporte aparente de membrana más allá del límite establecido por las fluctuaciones de equilibrio. El hecho de que no exista un límite finito para el promedio de los desplazamientos a tiempos largos ($\xi^2(t) \gg k_B T / (\sigma q^2 + \kappa q^4)$ a $t \rightarrow \infty$) indica no-ergodicidad y por tanto actividad fuera de equilibrio inducida por el movimiento conformacional producido por la hidrólisis del ATP sobre la terminasa. El mismo efecto es detectado sobre los espectros de la Fig. 29 donde puede observarse un decrecimiento monótono en todos los casos salvo en presencia de terminasa. Sin embargo, a altos q 's ($q > q_{act} \sim 10 \mu\text{m}^{-1}$), un incremento de las fluctuaciones es observable en presencia de terminasa, lo cual indica la presencia de movimientos exacerbados sobre pequeñas escalas espaciales correspondientes a la zona de influencia de cada uno de las unidades de translocación ($d < q_{act}^{-1} < 100\text{nm}$). En el caso activo, en presencia de ATP con actividad fosforilativa de la terminasa, las fluctuaciones son aún mayores y la zona anómala de crecimiento con el vector de onda emerge aun a q más bajos ($q_{act} \sim 5 \mu\text{m}^{-1}$), dando idea de la enorme actividad fuera de equilibrio de los motores de translocación en condiciones activas, lo cual da lugar a

fluctuaciones amplificadas sobre distancias incluso aún más largas, de varios centenares de nanómetros.

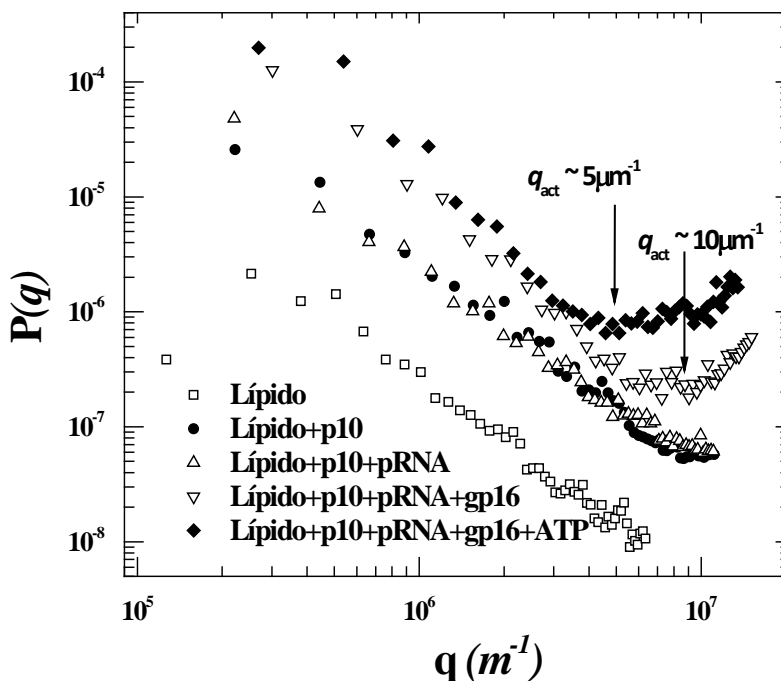


Fig. 29. Espectros estáticos de fluctuaciones para vesículas compuestas por DMPC/POPG/PZaPC (\square), en presencia de p10 (\bullet), en presencia de p10 y pRNA (Δ), p10+pRNA+gp16 (∇) y p10+pRNA+gp16+ATP (\blacklozenge).

Bibliografía

1. Alberts, B., et al., *Introducción a la Biología Celular / Essential Cell Biology*. 2011: Editorial Medica Panamericana Sa de.
2. Tamba, Y., et al., *Single GUV Method Reveals Interaction of Tea Catechin (-)-Epigallocatechin Gallate with Lipid Membranes*. *Biophysical Journal*, 2007. **92**(9): p. 3178-3194.
3. Betz, W.J., F. Mao, and C.B. Smith, *Imaging exocytosis and endocytosis*. *Current Opinion in Neurobiology*, 1996. **6**(3): p. 365-371.
4. Parra, E., et al., *A combined action of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C modulates permeability and dynamics of phospholipid membranes*. *Biochemical Journal*, 2011. **438**(3): p. 555-564.
5. Wendell, D., et al., *Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores*. *Nature nanotechnology*, 2009. **4**(11): p. 765-772.
6. Smith, D.E., et al., *The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force*. *Nature*, 2001. **413**(6857): p. 748-52.
7. Lopez-Montero, I., et al., *High fluidity and soft elasticity of the inner membrane of Escherichia coli revealed by the surface rheology of model Langmuir monolayers*. *Langmuir*, 2008. **24**(8): p. 4065-76.
8. Manneville, J.B., et al., *Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration*. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2001. **64**(2 Pt 1): p. 24.
9. Evans, E. and D. Needham, *Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1987. **91**(16): p. 4219-4228.
10. Evans, E. and W. Rawicz, *Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes*. *Phys Rev Lett*, 1990. **64**(17): p. 2094-2097.
11. Seifert, U. and S.A. Langer, *Viscous Modes of Fluid Bilayer Membranes*. *EPL (Europhysics Letters)*, 1993. **23**(1): p. 71.

CONCLUSIONES:

Conclusiones:

Se ha construido un dispositivo activo de compactación de ADN mediante métodos sintéticos utilizando una composición de membrana susceptible de reaccionar con los residuos situados en las cadenas laterales expuestas de los aminoácidos que conforman el complejo proteico $p10$.

- 1 Se ha demostrado que el empleo de lípidos oxidados mejora la inserción del complejo $p10$ en la membrana en condiciones de ortogonalidad, llegándose a alcanzar tasas de incorporación de hasta el 75%. Asimismo, el complejo $p10$ incluido en la membrana es capaz de soportar drásticos estreses como la deshidratación o los campos eléctricos.
- 2 Los lípidos oxidados, junto con los lípidos cargados, juegan un papel reblandecedor en la membrana lipídica disminuyendo la rigidez de curvatura.
- 3 La inclusión de la proteína $p10$ en la bicapa lipídica disminuye considerablemente la tensión de la membrana, así como los valores de rigidez de curvatura mediante un aumento de permeación a través de los poros conformados por el complejo $p10$.
- 4 El aumento de la permeación a través de la membrana influye significativamente en las regiones del espectro dominadas por las fluctuaciones de curvatura, dominio en el que se produce una disminución efectiva de la rigidez de curvatura (observable mediante un aumento de la amplitud de las fluctuaciones).
- 5 La incorporación de $p10$ en la membrana, afecta drásticamente a la dinámica de las fluctuaciones de membrana convirtiéndolo en un sistema más rápido. El aumento del flujo a través de los canales o el aumento del número de poros tiene una fuerte repercusión en las frecuencias de dispersión en el rango de q 's altos.

- 6 En la composición de la membrana, el lípido neutro mayoritario no afecta a la eficacia de incorporación del complejo *p10*.
- 7 Se ha demostrado experimentalmente el ensamblaje completo de la maquinaria de translocación de ADN.
La puesta en funcionamiento de esta maquinaria provoca una permeación exacerbada del dispositivo mediante la apertura funcional del poro, llegándose a alcanzar condiciones fuera del equilibrio.

Efficient Orthogonal Integration of the Bacteriophage ϕ 29 DNA-Portal Connector Protein in Engineered Lipid Bilayers

Lara H. Moleiro,[†] Iván López-Montero,[†] Ileana Márquez,[‡] Sonia Moreno,^{§,#} Marisela Vélez,^{‡,||} José L. Carrascosa,^{§,||} and Francisco Monroy^{*,†}

[†]Departamento de Química Física I, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

[‡]Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Marie Curie 2, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

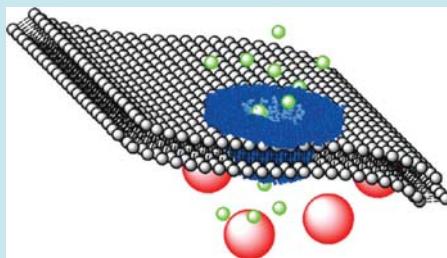
[§]Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, c/Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^{||}Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA Nanociencia), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ABSTRACT: The portal connector of bacteriophage viruses constitutes a robust molecular machine for DNA translocation. In this paper we propose an optimized reconstitution method for efficient orthogonal integration of native viral connectors into lipid bilayers, particularly of giant unilamellar vesicles. Our nanoengineering plan considers the hydrophilic connector protein of the bacteriophage virus ϕ 29 integrated into a specifically engineered bilayer made of “hydrophylized” lipids. From the precise knowledge of the connector structure, the membrane chemistry was designed by tuning reactivity in the bilayer using specific functional lipids. We show details on the reconstitution methods and experimental evidence about the integration of the portal protein in the engineered membrane.

The proposed route provides an efficient method for orthogonal integration of native viral connectors into lipid bilayers in conditions adequate for functional DNA translocation. This concept could be potentially exploited in advanced nanotechnological realizations, particularly for the integration of these powerful machines into giant lipid vesicles with the aim of building a cargo-device useful for gene delivery applications.

KEYWORDS: bacteriophage ϕ 29, DNA translocation, membrane pore, giant vesicles, membrane reconstitution, lipid membranes



The translocation of nucleic acids through different biological compartments is a fundamental event in different aspects of the cellular life cycle, *e.g.*, mRNA transport from the nuclei to the cytoplasm, cellular communication, infection, *etc.* Many of these events rely on the existence of macromolecular pores that function as sophisticated nanomachines. These machines have to overcome a number of basic problems for efficient translocation of extended nucleic acid polymers, mainly derived from the charged nature of the polynucleotide molecules, as well as from their high intrinsic rigidity.^{1,2} An interesting example for double stranded DNA translocation is offered by the packaging of the genome in bacteriophages.² The assembly of double stranded DNA bacteriophages follows a series of steps that are common to most of these viruses.^{3–7} A small number of viral proteins assemble first into a prohead that later incorporates the DNA. The packaging machinery is located at a unique vertex of the prohead (the portal) and comprises the head–tail connector and the terminases, which are involved not only in the selection of the DNA to be packaged but also in the ATP-driven DNA translocation.^{7,8} The packaging complex, or portal, is formed by the assembly of connector and terminases defining a hollow channel with a diameter slightly larger than the one of dsDNA.

These portals have been studied in detail in a number of phages: ϕ 29, T4, SPP1, T3/T7, ϵ 15, and P22. The connector is a pore-like structure that appears not only in bacteriophages^{9–12} but also in other viral systems such as Adeno and Herpes viruses.^{13,14} Despite the absence of a clear sequence homology, the structural analysis reveals a common topology, displaying a truncated cone shape composed of a dodecameric assembly with three general domains: stalk, wing, and crown.^{8,10,11,13,15,16}

During recent years, a large number of studies have focused on the use of biological and solid-state nanopores for diverse applications, from counting single molecules to genome sequence approaches.¹⁷ The high specificity of the viral connector for DNA translocation, together with its well-known structure, makes it an attractive system to bridge material engineering and synthetic structural biology in the context of the use of DNA-nanopores in synthetic tools and devices. Furthermore, the synthetic approach offers unique possibilities for the analysis of the physical mechanisms involved in polymer translocation along pore-like structures.

Received: January 20, 2012

Published: February 24, 2012

With the final aim to build a synthetic cargo-device with an active translocation capability, we propose using the connector of bacteriophage $\phi 29$ as a DNA-specific nanopore inserted in lipid bilayers. The idea is however not new. Recent studies by Guo *et al.* have focused efforts on the synthetic integration of modified $\phi 29$ -connectors (hereinafter p10 protein) into lipid bilayers.^{18–22} The first reconstitution of an hydrophobically modified p10 protein in lipid bilayers (giant vesicles and supported planar membranes) was achieved by these authors,¹⁸ who reported evidence of orthogonal insertion susceptible to give rise to translocation capability.^{19–22} That method consisted of protein incubation in the presence of lipid bilayers made of dioleoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine (DOPC),¹⁸ a typical fluid bilayer former.

In this work, we propose an alternative synthetic route based on the chemical modification of the lipid bilayer for optimal insertion of the native p10 connector at orthogonal orientation. We propose a simple and robust synthetic concept based on the use of oxidized lipids able to chemically react with the outer surface of the connector protein. This strategy requires not only a detailed scanning of the connector structure for seeking functional groups adequate for lipid reactivity but also a proper structural matching at the hydrophobic core of the bilayer. Our engineering approach combines minimal protein manipulation with maximal membrane integration, resulting in an optimized number of portals orthogonally inserted in the membrane.

Surface Structure of the Native Connector (p10).

Figure 1 shows the 3D structure of the connector of phage $\phi 29$ ²³ as obtained from the PDB (PDB id: 1ijg). The atomic structure reveals that each of the 12 monomers of the connector protein that builds the connector has an elongated shape and is composed by a central, mainly α -helical domain

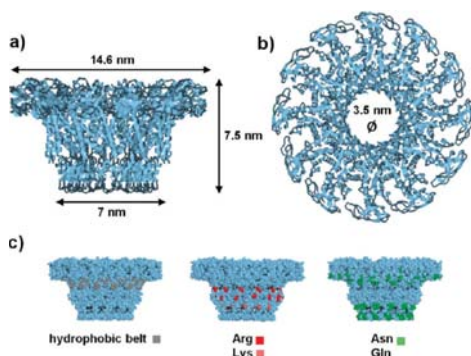


Figure 1. (a) Three-dimensional structure of the p10 connector ($\phi 29$ -bacteriophage) as viewed from its lateral side. The circular dimensions correspond to the outer diameter of the crown (14.6 nm) and distal stalk (7 nm) portions. The object thickness is 7.5 nm, larger than a typical lipid bilayer (ca. 4 nm). (b) Plan top view of p10; dimensions: 14.6 nm outer diameter, 3.5 nm inner diameter of the central pore. (c) Axi-symmetric distribution of relevant aminoacids exposed to the outer surface of the p10 dodecamer (see text for details). Left panel: most hydrophobic exposed rests concentrate at the northern stalk just below the wing (gray). Central: basic rests (Arg/Lys) in the stalk portion at near equatorial emplacement (Arg: red; Lys: light red). Right: surface distribution of hydrophilic aminoacids with positive charge (Asn/Gln: two green belts).

that includes a three-helix bundle, a distal α - β domain, and a proximal 6-fold stranded SH3-like domain.²⁴ The monomers assemble in a propeller-like dodecamer with an external diameter of 14.6 nm and a height of 7.5 nm (see Figure 1a). The dodecamer is a compact structure with a stalk and a wing structural domain, which also shows a conspicuous wide channel ($\phi = 3.5$ nm diameter) that runs along the axis of the particle (see Figure 1b). The connector is oriented with the wing domain inserted in the viral shell, while the stalk extends outside the virus particle. The channel in the stalk region is built by a specific fold of α - β motifs that seems to be present in several connectors of different viral systems.^{8,10} The surface of the internal channel has an overall electronegative character, and its entrance presents an acidic character (Glu189, Asp19, and Asp194).

Figure 1c shows chemical details of the external surface of the dodecameric particle p10. The complex presents a polar character in the wider wing domain, the area that is inserted into the interior of the viral head. Just below the wing domain, there is a belt of hydrophobic residues (Phe 24, Ile25, Leu28, Phe60, Phe128, Pro129, and Pro132; left panel in Figure 1c). It is noteworthy to mention that this 12-fold area of the connector is the one that contacts the five-fold vertex of the viral capsid, a symmetry mismatch that has been involved in different packaging model mechanisms. The stalk region has a surface with exposed charged residues (Arg17, Arg22, Lys172) at the equatorial location (Figure 1c; central panel), as well as several Asn and Gln residues concentrated at the two distal portions of the protein stalk (Figure 1c; right panel). All of these residues confer a whole hydrophilic character to the stalk area (Figure 1c). As surface-exposed basic residues could be potentially used for chemical bonding with carboxylic tailored lipids, we searched the surface reactivity of the p10 particle, focusing in the basic residues exposed to the surface exterior. Particularly, we found Arg17, Arg22, and Lys172, three surface exposed basic (positively charged) residues well suited for acid/base reactivity (red belts in Figure 1c). The guanidinium group of arginine (pK 13.6) was positively charged in acidic, neutral, and even most basic environments. Because of the conjugation between the double bond and the nitrogen lone pairs, the positive charge was delocalized, enabling the formation of stable intermediates by multiple hydrogen bonding responsible for the extreme basicity of guanidine against carboxylic acids. Consequently, exposed arginines of p10 might exhibit a strong reactivity against carboxylated lipids in moderately basic (pH 8) aqueous solution. Figure 2a shows the location of the reactive arginine residues exposed at the outer surface of the p10 complex. A dense distribution placed practically equatorial is present in the stalk portion, providing a highly basic reactive belt for optimal bonding with acidic lipid tails in the bilayer core. In addition, the lateral group in lysine is a primary amine behaving as a weaker base than arginine in aqueous solution (pK 10), consequently with a relevant, but significantly lower, reactivity against oxidized lipids. Therefore, in the present work we decided to use fluid lipid bilayers doped with a small amount of PAZPC (10% molar), an oxidized lipid with the short saturated chain (C0:9) tailored with a carboxylic acid group (see Figure 2b). At moderately basic pH (≈ 8), the end group appeared predominantly deprotonated in the negative carboxylate form. Consequently, when included in a bilayer this charged tail might reverse the RCOO[−] group that became exposed at the aqueous outer surface. This reactive exposure might allow for adequate binding of lipids tails to primary

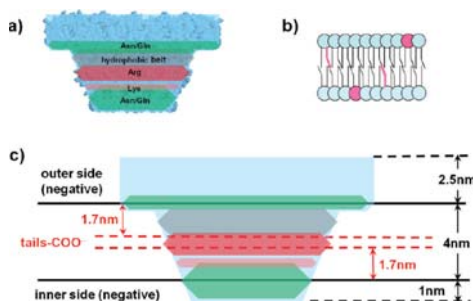


Figure 2. Architectural description of the lipid–p10 protein membrane assembly. (a) Surface chemistry of p10 connector: highly hydrophobic belt for adhesive interaction with lipid tails (in gray); equatorial arginine and lysine residues with for reactive interaction with PAzPc (in red); distal cationic belts (Asn/Gln at pH 8) for electrostatic coupling with the negatively charged membrane surface (in green). (b) Lipid bilayer: The lipid component is based on DOPC (blue heads) mixed with the functional oxidized lipid PAzPC (10% mol; red tails) and the anionic lipid POPG (10% mol; red heads). (c) Protein–lipid membrane complex: the lipid bilayer is 4 nm thick, with the functional carboxylate groups ($-\text{COO}^-$) of PAzPc dangling 1.7 nm below the membrane surface. The anionic lipid (POPG) endows net negative charge to both surfaces. The surface groups in the native p10 protein interact with the modified bilayer at different levels: (i) electrostatic counterbalance Asn/Gln–POPG at the membrane surface; (ii) hydrophobic matching at the near-surface hydrophobic core; (iii) Arg(Lys)–PAzPc amidation at the intermonolayer region.

amine rests in the p10 connector surface. When reactive amidation occurs the respective charges are counterbalanced, the resulting RCOO-NH-p10 group being easily accommodated at the bilayer core with a reduced electrostatic penalty. The reversed tails of oxidized lipids provided covalent reactivity for surface exposed basic aminoacids in p10, mainly arginine and lysine.

At the moderately basic conditions considered here (pH 8), the amide aminoacids asparagine (Asn) and glutamine (Gln) are in the positive ammonium form. These rests were found also exposed at the outer surface of p10, principally as two positively charged belts located at distal locations with respect to the equatorial position (see green belts in Figures 1c/2a). The first Asn/Gln distribution is concentrated at the inner edge of the upper crown, 2.5 nm deep with respect to the major radius surface of the connector. The second one is a sparse distribution at the base of the stalk. As compared to basic amines (Arg, Lys), these amides are very weak bases and thus without reactivity interest at moderate basic pH. However, these two coronas endow excess positive charge adequate for optimal electrostatic association with negative lipid membranes. Thus, negatively charged lipids, with the phosphatidyl-glycerol head, for instance, should be included in an optimized formulation (see Figure 2b).

Integration Strategy: Hydrophilizing the Membrane with Oxidized Lipids. Because of their acid reactivity, oxidized phospholipids with hydrophobic tails barbed with a carboxylate moiety are known to bind membrane receptors and proteins.^{26,27} Different proteins rich in amine lateral group basic amino acids have been shown to strongly bind to micellar aggregates of oxidized lipids.²⁸ The extent of binding is reduced upon lowering the pH, which would protonate the carboxylic

acid and thus reduce reactivity.^{29,30} Furthermore, owing to their atypical structure (one shorter and polar acyl chain), these lipids are expected to alter the physical properties of the lipid bilayer membrane. Their organization properties were investigated Sabatini *et al.*³¹ by measuring force area and surface potential isotherms in conjunction with fluorescence microscopy in mixed monolayers with DPPC. The results revealed an overall monolayer expansion due to the extended configuration of the oxidized chains into the aqueous phase. In bilayers, the authors suggested a reorientation of the hydrophilic tailed chain so avoiding the large energy penalty of embedding a charged group in the hydrophobic core. Further evidence for complete reversal of the oxidized acyl chain was recently confirmed by Mouritsen *et al.*²⁸ from MD simulations.²⁸ The presence of chain-reversing charged lipids might directly affect bilayer structure of typical phospholipids. Particularly, the chain order and packing profiles are both expected to reduce, thus resulting in a significant softening.²⁸ Regarding electrostatic effects, the presence of net negative charge in oxidized lipids was found to effectively lower the phosphate-choline dipole near the interface.²⁸ Therefore, the acidic tails are expected not only to react with the basic groups of the p10 protein but also to disrupt the lipid packing causing a structural plasticity playing in favor of connector insertion.

With the objective to spatially modulate lipid–protein interactions at different levels in the bilayer, we have taken advantage of the surface chemistry of the connector protein, which is distributed as parallel belts formed by 12-fold axial repetitions of exposed residues with different chemical affinities. In Figure 2a, the four relevant parallel surface regions in the stalk portion are shown: the reactive (pH 8) Arg/Lys equatorial belt (left), the northern one formed by hydrophobic aminoacids (center), and the southern one constituted by cationic Asn/Gln residues (right). Figure 2b is a schematic of the lipid bilayer, based on DOPC supplemented with 10% of reactive lipid PAzPC tailored with an acid chain and 10% of anionic-head DOPG. The cartoon in Figure 2c depicts the structural scenario for orthogonal insertion, where the p10 connector interacts at these three different levels with the lipid bilayer. As structural bilayer former, we considered DOPC (C18:1), a fully unsaturated phospholipid combining packing ability typical of phosphocholine head with chain disorder sufficient to form stable bilayers with low rigidity and high fluidity.³² The two unsaturated chains endowed conformational plasticity and thus an enhanced capacity to match the thickness of different embedded objects.³³ The average thickness of single DOPC bilayers is 4.0 nm (Figure 2c), as determined by X-ray scattering³⁴ and AFM,^{35,36} a size 3.5 nm thinner than the transverse height dimensions of the p10 complex (Figure 1a). The considered oxidized lipid (PAzPC) had the same phosphocholine head as DOPC linked to a palmitoyl saturated chain (C16:0) nearly matching the thickness of the DOPC matrix. The COOH -tailored chain was C8:0, a length half the thickness of the palmitoyl core (C16:0). This determines the position of the reactive carboxylate group (lipid-COO^-) at a distance 1.7 nm beneath the outer bilayer surface (Figure 2c). This acid group could efficiently react with the basic Arg/Lys-belt of p10. Consequently, when stabilized inside the hydrophobic core of the bilayer as a non-charged amide ($-\text{COO-NH-p10}$), the resulting covalent linkers will nearly accommodate the equatorial belt of p10 as a non-charged element in the central, intermonolayer region of the lipid bilayer (see Figure 2c; red dashed bands).

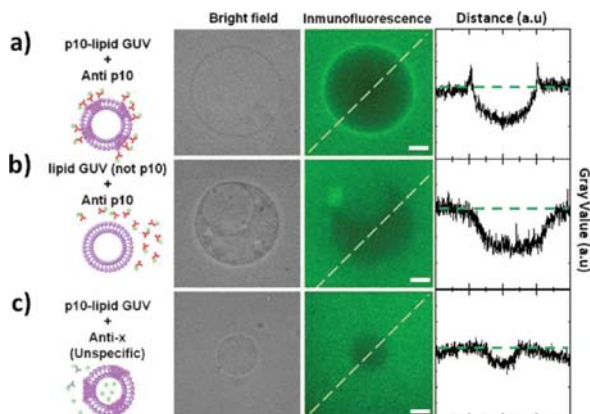


Figure 3. Immunofluorescence tests on giant vesicles based on the reactive lipid component (DOPC + 10% PAzPC + 10% POPG). The fluorescence intensity profiles in the right panels evidence either the presence (positive) or depletion (negative) of fluorescent antibody with respect to the average concentration in the incubation medium (dashed line). (a) Positive: GUVs prepared in the presence of p10-protein show an increased concentration of the specific fluorescent antibody in the membrane site, thus indicating p10 integration. (b) Negative control: GUVs prepared in the absence of p10-protein are not fluorescently labeled by the specific anti-p10 antibody. No higher fluorescence intensity is detected in the membrane site, the intensity profile varying monotonically to a negative value, corresponding to dye depletion, in the vesicle lumen. (c) Blank control: an unspecific fluorescent antibody does not label the vesicles prepared in the presence of p10-protein.

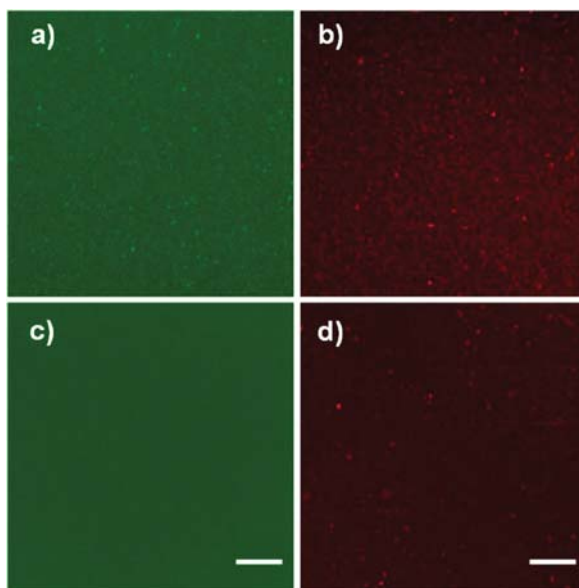


Figure 4. Permeability experiments where the retention of fluorescent probes of different size is tested by confocal microscopy in LUVs. The probes used were calcein, a low molecular weight probe diffusible across p10 pores (green channel; a, c), and rhodamine-dextrane (rhDx), a large polymeric probe not able to trespass the tight p10 pores (red channel; b, d). Top panels: full-retention control. The vesicles were prepared in the absence of protein, thus both probes, calcein (a) and rhodamine (b), are retained inside. Bottom panel: size-selective retention. When prepared in the presence of p10 protein, porous vesicles show selective permeability to small objects (calcein; c) and retention against large polymer molecules (rhDx; d).

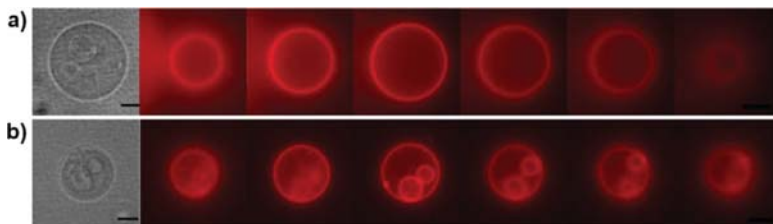


Figure 5. Permeability experiments in oligolamellar vesicles. Access to the internal compartments of the soluble dye FM1-43 (added from the outer solution) evidence membrane porosity and connectivity with internal compartments through p10 connector. Oligolamellar GUVs prepared (a) in the absence (control) and (b) in the presence of protein (positive).

Furthermore, the negatively charged phospholipid DOPG was included to endow the bilayer with a negative surface charge (Figure 2b) adequate for electrostatic matching with the two distal positive belts of p10, mainly constituted by Asn and Gln (see Figure 2a/c; green bands).

Finally, if orthogonal integration occurs, additional hydrophobic matching between the acyl lipid chains and the hydrophobic belt of p10 is expected at the outer core of the lipid bilayer (see Figure 2a/c; gray band).

RESULTS AND DISCUSSION

Membrane Integration in GUVs: Immunofluorescence Detection. Figure 3 shows immunofluorescence evidence for protein integration in the lipid bilayer of giant unilamellar vesicles electro-swelled in the presence of p10-connector (see Methods). When p10 was present (Figure 3a), the p10-specific dye antibody revealed p10 accumulation in the membrane with respect to the bulk solution (see intensity profile in Figure 3; top panel), a clear evidence for protein integration in the membrane. Consistently, no enhanced membrane fluorescence is observed in the absence of connector or when an unspecific antibody was used in the presence of p10-GUVs, the dye being found homogeneously distributed in the solution (Figure 3b,c). In the later case, the unspecific antibody was indeed observed in the solution but did not accumulate in the membrane. From these results, the membrane integration of the p10 connector was unambiguously determined; however, nothing was known about its orientation with respect to the bilayer plane.

Permeability Tests. Orthogonal integration with respect to the bilayer plane is a first requirement for functional translocation of DNA by the portal protein. To obtain evidence for a possible orthogonal orientation, we performed three different tests where the permeability of different fluorophores across the pores was checked by fluorescence microscopy.

Size-Probe Retention in LUVs. The lipid bilayer is known to be a permeability barrier against hydrophilic molecules.³⁹ Calcein is a water-soluble low molecular weight fluorescent dye ($M_w = 622.53$ Da), well-known to be efficiently retained inside liposomes.⁴⁰ However, calcein is sufficiently small to permeate across the 3 nm diameter p10 pores. On the other hand, rhodamine-labeled dextran (rh-Dx; $M_w = 70$ kDa, $R_g \approx 20$ nm) is a polymer dye that should be unable to go through the p10 pore ($R_g \approx 20$ nm $\gg \phi = 3.5$ nm). Relatively large proteoliposomes ($1 \mu\text{m}$ diameter) were prepared by co-extruding lipid suspension with the protein solution (see LUVs for Confocal Microscopy in Methods). The proteo-LUVs were prepared in the presence of rhodamine (0.5 mM; Figure 4a) and calcein (0.5 mM; Figure 4b), and then the vesicle

suspensions were observed under a confocal microscope (see Methods). Figure 4 shows the confocal fields imaged 24 h after dilution. Let us first discuss the control case in the absence of protein. In Figure 4a,b (top panels), the presence of fluorescent spots suspended in a darker background clearly reveals fluorophore retention inside liposomes, independently of the probe size. Similar images are obtained at longer times, confirming the barrier character of the lipid bilayer for both dyes (calcein, Figure 4a and rhodamine-dextran, Figure 4b). Then, p10-proteoliposomes were prepared by co-extrusion of the lipid suspension (16 mg/mL lipids, 0.5 mM calcein, 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 200 mM NaCl) in the presence of protein at a very low content with respect to lipids (1/200,000 P/L molar ratio). Similarly to the control test, the proteoliposome suspension was diluted in dye-free buffer (1:4 v/v). Figure 4c,d (bottom panels) show images taken in the presence of protein. The fluorescence of the small fluorophore calcein eventually becomes equilibrated in and outside the vesicles, indicating that the presence of p10 portal proteins endows porosity to the membrane. The high-molecular-weight dye rhodamine-dextran however does not permeate through the small pores and remains efficiently entrapped inside the vesicles. Therefore, vesicles are not visible in the green channel corresponding to calcein (Figure 4c) but are clearly discernible in the red channel corresponding to rhodamine-dextran (Figure 4d).

Pore Connection to Internal Compartments. To confirm the presence of orthogonally oriented pores we have taken advantage of the fluorescent emission of FM1-43, an extrinsic water-soluble probe having high quantum yield in hydrophobic environments that becomes completely quenched in aqueous media.⁴¹ In addition, this dye exhibits high affinity for lipid environments but is impermeable to membranes. In a vesicle suspension, because water molecules strongly quench FM1-43 fluorescence, emission is observed only once incorporated into the lipid bilayer. Consequently, when added in the outer suspending medium the dye might label only the external leaflet of lipid vesicles. However, if water pores were present in the membrane, the probe should be able to cross inside the vesicle lumen, gaining access to internal compartments (eventually, internal membranes in oligolamellar vesicles). We prepared giant vesicles with an oligo-lamellar structure and checked the dye action of FM1-43 to test its transport in the absence or in the presence of pore channels allowing communication between internal compartments. Figure 5 shows a typical FM1-43 permeability test. The oligolamellar character was revealed in the bright field images. The fluorescence images show a tomographic scan of the same vesicle between their two

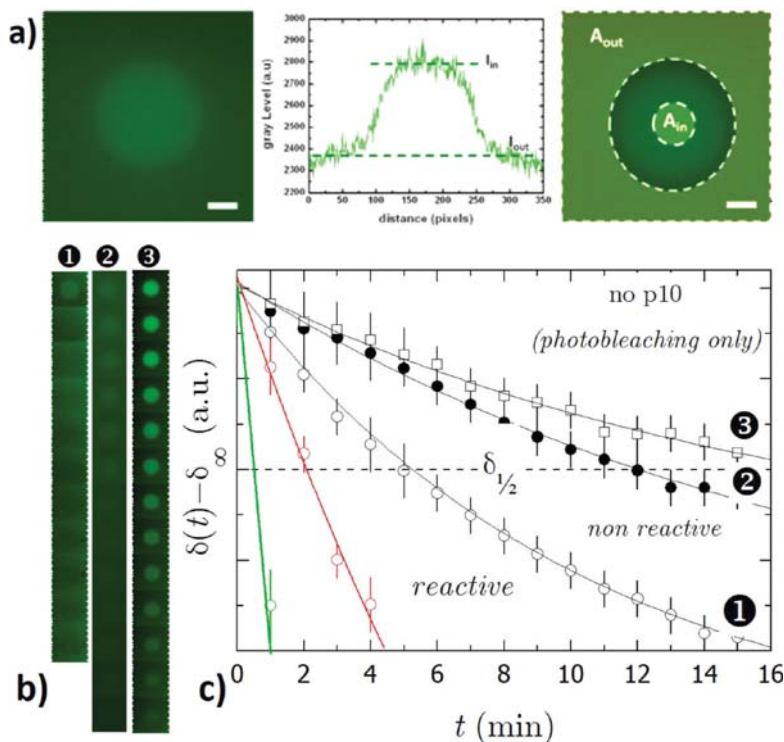


Figure 6. Calcein-permeability kinetics. (a) Image analysis. A given vesicle filled with calcein (left panel) is digitized in ImageJ as a spherical distribution with inner fluorescence intensity I_{in} higher than the external background I_{out} due to residual calcein after washing out (central panel). For quantitative calculation of the normalized intensity $\delta(t)$ using eq 1, we used the integrated area of the external background A_{out} with average intensity I_{out} and the integrated area of the inner core A_{in} where the maximal intensity I_{in} is recorded. (b) Kinetic recording of a typical GUV prepared: ① with p10-portals integrated in a reactive DOPC-bilayer containing PAzPC (10%) and DOPG (10%); ② with p10-portals incubated with a non-reactive DOPC-bilayer, and ③ without protein. (c) Normalized intensity decays corresponding to different kinetic experiments as in panel b: ① p10 integrated in the reactive bilayer (open circles); ② p10 integrated in the non-reactive bilayer (●); ③ no protein, DOPC only (□). Three different protein concentrations were checked in the reactive-integration schema: $P/L = 1/370,000$ (black ○); $1/37,000$ (red ○); $1/3,700$ (green ○). The experimental curves are shifted with the infinity intensity δ_{∞} recorded at a very long time, typically 1 h after beginning the experiment. The dashed horizontal line represents the half-life level for estimating the characteristic decay time, $\delta(t) = \delta_{1/2} = 1/2$ at $t = \tau_{1/2}$. Continuous lines are a simple visual guide. The experimental values correspond to an average over a population of 20 different vesicles recorded in different experiments. The error bars correspond to standard deviations.

poles (the central image typically corresponds to the equatorial plane). When no protein is present (Figure 5a), the fluorescent probe remained at the outer leaflet of the external membrane, the internal compartments remaining inaccessible to the fluorescent dye (no fluorescent emission is detected in this case from the internal membranes). However, in the presence of portal protein (Figure 5b), the existence of different internal compartments was clearly revealed in the fluorescence images, a fact possible only if probe transport across the membranes is assumed. Consequently, the data confirmed the presence of open portals orthogonally integrated in the membranes, thus allowing for connecting different compartments to permeating water and solutes.

Permeability Kinetics in GUVs. From the above experiments, we deduced the existence of membrane integration of the

connector portal at orthogonal orientation. Oxidized lipids were used as a covalent linker favoring membrane incorporation through covalent anchoring at the hydrophobic core of the bilayer. Consequently, a larger integration yield is expected from the present reactive strategy than under simple incubation with an inert bilayer. To verify this point, we comparatively probed permeation kinetics in single GUVs prepared (a) in the presence of oxidized lipids (10% PAzPC molar content) at a relatively low protein to lipid molar ratio ($P/L = 1/70,000$) and (b) in the absence of oxidized lipids at comparatively much higher protein content ($P/L = 1/75$). Fluorescence-loss experiments were probed by optical microscopy in single GUVs containing different dyes. As above, we used calcein, a small green probe able to permeate through narrow channels, and rhodamine-barbed dextran (70 kDa), the negative

permeability control unable to transpose through connector pore. In these experiments, GUVs and proteoGUVs were prepared in the presence of equal amounts of the two fluorescent probes (dye 1 mM; buffer: sucrose 200 mM, TrisHCl 50 mM, NaCl 200 mM) following the standard procedure described in Methods. Prior to observation by microscope, the suspension was centrifuged in an Eppendorf tube (45,000 rpm, 1 h). Then, a small aliquot (10 μ L) was carefully pipetted from the vesicle sediment and dissolved in a drop of buffer solution (containing no fluorescent probes; buffer: 208 mM glucose, TrisHCl 50 mM, NaCl 200 mM) previously placed on a microscopy slide. This protocol allowed for accurate time-recording of fluorescence 1 min after mixing, the time necessary for vesicles to sediment and become visible in the microscopy field. No significant dye release is expected during such a short lag time. Depending on the number of pores, this delay effect produced an undetermined initial decay in the fluorescence signal, preventing an absolute comparison between different vesicles. However, the fluorescence intensity decays can be normalized relative to the initial intensity measured at an arbitrary initial time ($t_0 = 1$ min) and compared between vesicles. Probe photobleaching was minimized by recording discrete fluorescence images every minute at a short exposure time (100 ms). Accidental photobleaching was prevented by localizing a given GUV in bright field and then recording its fluorescence intensity in the corresponding fluorescence channel. The following vesicle analyzed was chosen far away from the former observation field, eliminating previous exposure to the excitation beam. Figure 6 shows kinetics recorded in the calcein channel. From a quantitative standpoint, fluorescence losses can be quantified as the difference in averaged intensity between the vesicle lumen and the bulk exterior (see schematic in Figure 6a):

$$\delta(t) = \frac{A_{\text{in}}I_{\text{in}}(t) - A_{\text{out}}I_{\text{out}}(t)}{A_{\text{in}} + A_{\text{out}}} \quad (1)$$

where I_{in} and I_{out} represent the integrated intensities in the inner circle and in the outer sector, respectively. The intensities are weighted by the respective areas A_{in} and A_{out} . The images were treated using ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).⁴² For every case, about 15–20 vesicles were analyzed, the final relative intensities being a statistical average performed over a vesicle population.

Panel ① in Figure 6b shows a typical vesicle where p10 portals were membrane-inserted following our reactive strategy at P/L = 1/70,000 protein-to-lipid molar ratio. The initial fluorescence level was in this case relatively weak, suggesting significant probe losses during the initial lag time. In the next two frames (2 min after t_0), the fluorescence intensity between the lumen and vesicle exterior was practically equal, suggesting a rapid diffusion of calcein across the portal pores. At longer times ($t > 2$ min), the content loss was so efficient that calcein was observed more brilliant in the surrounding medium than in the vesicle lumen, the relative intensity becoming negative at enough long times ($\delta_{\infty} < 0$). This is a fact closely related to the facilitated free diffusion of the fluorescent probe from a practically infinite bulk reservoir with respect to the relatively impeded diffusion through the pores, i.e., once diffused out from the vesicle interior, calcein is replaced faster in the accessible outer volume than in the restrained inner lumen. For comparison, a similar time recording for vesicles with connectors inserted in non-reactive conditions (DOPC

membrane; no PAzPC, no DOPG, pH 7) is shown in panel ② of Figure 6b. Similarly to the former case, a weak contrast was observed at starting time (t_0), suggesting calcein loss through the pores during the incubation lag time. However, the relative loss of fluorescence from the vesicle lumen was observed to be comparatively slower in this case than in the former one, a fact intrinsically related to the existence of a smaller number of transporting pores in the non-reactive case. Spurious fluorescence losses due to intrinsic photobleaching were probed in control experiments performed in the total absence of p10 protein (Figure 6b; panel ③). As expected for a total retention case, the initial calcein intensity was found to be high inside the vesicles. Very slow intensity decay was observed with time, a clear sign of probe trapping inside the vesicle (the fluorescence decay being representative of probe photobleaching).

The numerical results are plot in Figure 6c, which collects the averaged kinetic curves calculated with eq 1 for the three cases in Figure 6b. A fast decrease of fluorescence contrast is observed for vesicles with p10 portals integrated by the covalent strategy using oxidized lipids. A correlated behavior was observed at different P/L ratios: the higher the protein content the faster the fluorescence decay (see Figure 6; open circles). This demonstrates the quantitative correlation between the amount of integrated protein and the strength of pore functionality achieved in the reactive schema. For these vesicles at reactive conditions, the fluorescence loss is characterized by a very short decay time, e.g., at P/L = 1/37,000, the decay time was found as short as $\tau_{\text{react}} \approx 2$ min (defined as an average half-life time when $\delta(t = \tau_{1/2}) = 1/2$). However, for vesicles prepared with the same protein content (P/L = 1/37,000) at non-reactive conditions, the characteristic emptying time was found considerably longer, $\tau_{\text{nonreact}} \approx 12$ min (see Figure 6c; case ②), indicating a slower calcein loss through a reduced number of membrane pores, significantly smaller than in the reactive method using oxidized lipids. Indeed, the decay in fluorescence intensity was found in that case similar to the intrinsic calcein photobleaching measured when no protein is present (Figure 6c; case ③). In this control, vesicles were prepared in the absence of protein with the same lipid cocktail as in the reactive case (DOPC/PAzPC/DOPG), thus assuring an adequate comparison with the permeability experiment. Assuming that the rate for calcein diffusion across the membrane is proportional to the number of translocation portals, the relative amount of membrane pores can be estimated as $\rho_{\text{react}}/\rho_{\text{nonreact}} \approx \tau_{\text{nonreact}}/\tau_{\text{react}} \approx 6$. However, the decay curve was found practically equal in the non-reactive case (②) as for the photobleaching curve (③), suggesting a low dye permeability caused by a small fraction of open portals integrated at orthogonal configuration. Consequently, the integration yield by the covalent strategy using oxidized lipids (case ①) is at least 6-fold higher than by the simple incubation method (case ②).¹⁸

As a control for blocked diffusion across p10-pores, we show in Figure 7a results for the fluorescence intensity decay of the high- M_w dye (rhodamine-dextran) in the same three cases as with calcein. Because such a polymer coil is unable to traverse the p10 channel, vesicles containing membrane pores exhibit a fluorescence decay similar to the photobleaching control. Consistent with our prediction, kinetic data in Figure 7b show similar behavior, thus confirming the retention of the large molecules inside the vesicle lumen independently of the membrane components.

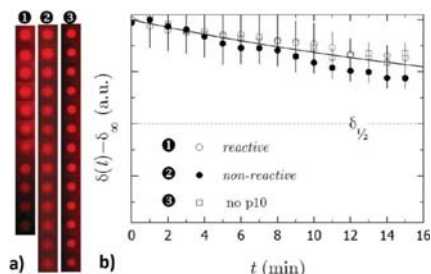


Figure 7. Rhodamine-dextran permeability kinetics. (a) Kinetic recording of a typical GUV prepared: ① with p10-portals integrated in a reactive DOPC-bilayer containing PAzPC (10%) and DOPG (10%); ② with p10-portals incubated with a non-reactive DOPC-bilayer, and ③ without protein. (b) Normalized intensity decays corresponding to different kinetic experiments as in panel a: ① p10 integrated in the reactive bilayer (○); ② p10 integrated in the non-reactive bilayer (●); ③ no protein, DOPC only (□). As in Figure 6, the curves are shifted with the infinity intensity δ_∞ . The experimental values correspond to an average over population of 20 different vesicles recorded in different experiments. The error bars correspond to standard deviations.

Structural Analysis by AFM. Atomic force microscopy was used to explore the incorporation of the connectors into the bilayer. Liposomes containing the protein were incubated over a mica surface in the presence of (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , and 10 mM CaCl_2), conditions under

which lipid vesicles fuse forming planar lipid bilayers. AFM images of the lipid surfaces were taken operating the microscope in the jump mode.⁴³ Figure 8A shows the lipid surface formed from liposomes of the same lipid composition but without protein inserted. The presence of oxidized lipids in the mixture allowed the formation of smooth membranes of ca. 4 nm thickness (Figure 8A; bottom panel), a value compatible with the accepted thickness of supported lipid bilayers. Vesicles with incorporated connector over a large range of protein–lipid molar ratio ($P:L = 1/37,000$ to $1/1,000$) were also able to fuse on the mica surface. A typical AFM image ($P/L = 1/37,000$) is shown in Figure 8B1. Here, we can discern inserted connectors (α -configuration) from brighter grains corresponding to thicker objects sitting on the membrane. The thickness of these larger objects is ca. 7 nm (Figure 8B1; left panel), a size compatible with the dimensions of single connector units not integrated in the membrane (β -configuration; see cartoon in Figure 8B1). Figure 8B2 shows a high-resolution zoom of the square area delimited in Figure 8B1. Inside this membrane sector we count a number $n_p = 28$ of single protein objects integrated in the bilayer (Figure 8B2; $S = 1 \mu\text{m}^2$). The surface density of integrated protein can be estimated with respect to lipids as n_p/n_l . Here, n_l is the number of lipid molecules inside the considered membrane sector, $n_l = (S - n_p a_p)/a_l$, which is mainly determined by the molecular area of the lipid molecule $a_l \approx 0.8 \text{ nm}^2$.^{2,44} The lipid density is corrected by a factor $-n_p a_p$, the surface area occupied by protein molecules (a single protein occupies $a_p = \pi R^2 \approx 167 \text{ nm}^2$; $R \approx 7.3 \text{ nm}$). Consequently, for the membrane patch displayed in Figure 8B2, the relative density of integrated protein is estimated as $n_p/n_l = n_p a_l / (S -$

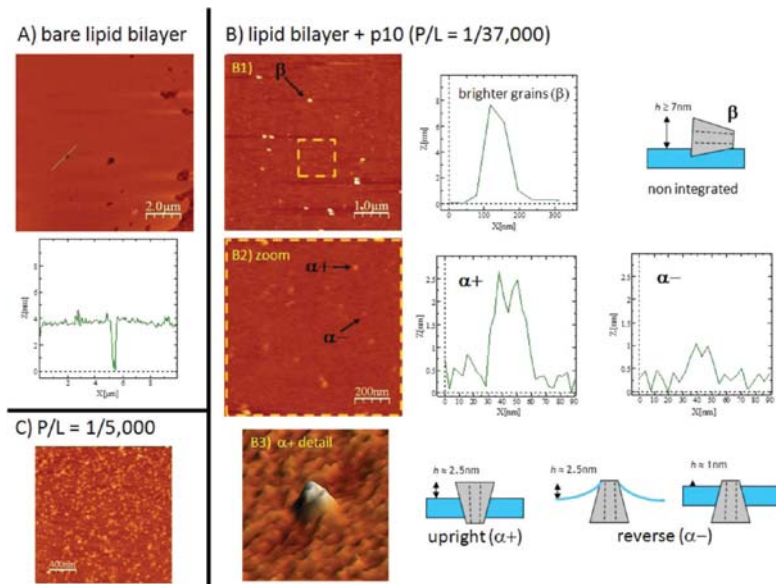


Figure 8. AFM structural analysis of native p10-protein integrated in a reactive bilayer (DOPC/PAzPC/DOPG; 8/1/1; pH 7.8). (A) Bare lipid bilayer. (B) Reactive bilayer incubated in the presence of p10-protein ($P/L = 1/37,000$). (C) Membrane integration at a higher protein content ($P/L = 1/5,000$).

$n_p a_p \approx 2 \times 10^{-5}$, a value slightly lower but in rough quantitative agreement with the nominal P/L content of the proteoliposome preparation ($P/L = 1/37,000 = 2.7 \times 10^{-5}$). This estimation confirms the proposed reactive schema with a high integration efficiency. A detailed analysis revealed the existence of two classes of membrane protrusions with different height and diameter. Particularly, the larger spots ($\alpha+$) were found overhanging *ca.* 2.5 nm out with respect to the basal plane of the bilayer (Figure 8B2; right panel; $\alpha+$), a size compatible with the dimensions of the crown portion of the connector (see Figure 1a and cartoon in Figure 8B2). Figure 8B3 enlarges one of these $\alpha+$ grains at ultrahigh resolution. The presence of a central concavity in these objects confirms them as a portal element with an open pore. Among the 28 single proteins counted in Figure 8B2, we assign 17 to the thicker $\alpha+$ objects (60%). Arguably, the connectors integrated in the reversed configuration ($\alpha-$) might appear in the AFM images thinner and smaller than these orientated upright. However, because the flexible bilayer is topologically adaptive around the rigid connector (see cartoon in Figure 8; intermediate between $\alpha+/ \alpha-$), some of the larger spots could expectedly correspond to connectors in the reverse configuration. This could explain why one counts an apparently fewer proportion of smaller objects with the reversed configuration (in Figure 8bB2; 11 $\alpha-$ /28 total, 40%). The smaller objects found in the AFM images were observed significantly thinner (*ca.* 1 nm: see Figure 8B3; right panel), a qualitative set of dimensions compatible with the $\alpha-$ reversed configuration of the connector. In this case, the observed object could correspond to the distal portion of the connector stalk protruding out the bilayer plane. Therefore, although the results suggest a mutual equivalence between the two different orthogonal orientations, *i.e.*, $[\alpha+] \approx [\alpha-]$, no unequivocal discrimination (nor of intermediate inclinations) is possible from the present experiments. Figure 8c shows a typical AFM image obtained at a higher protein concentration ($P/L = 5,000$). Particle counting analysis with WSXM³⁸ provided a value $n_p \approx 10^3$ of hill-like objects (with a height between 0.5 and 3 nm) found in the scanned area ($S = 4 \mu\text{m}^2$). The estimated protein density was estimated to be $n_p/n_i \approx 2 \times 10^{-4}$, in close quantitative agreement with the nominal value, $P/L = 2 \times 10^{-4}$. Again, we confirm the membrane reactive schema with a high integration efficiency, even higher with increasing the protein content.

Conclusions. Efficient membrane integration of native p10-portals was pursued at orthogonal configuration. We have proposed a chemical route based on the spatial matching of the protein–lipid interactions at different levels in the lipid bilayer. Covalent, electrostatic, and hydrophobic cohesive interactions were promoted by introducing different functional lipids in the membrane formula. The protein was integrated in the functional lipid bilayer of giant unilamellar vesicles prepared at reactive conditions provided by moderately basic pH (7.8). With the objective of testing pore integration at orthogonal configuration, we performed permeability tests with different fluorescent probes. The unequivocal existence of material diffusion through the membrane pores was deduced from those studies. The kinetic analysis of the permeability data allowed for a quantitative estimation of the orthogonal integration rate at different experimental conditions. The orthogonal orientation was microscopically revealed from a detailed structural analysis performed by AFM. As a major conclusion, from a synthetic standpoint, the present reactive method is very efficient, orthogonal integration occurring at a quantitative extent

compatible with preparative P/L ratio. This integration efficiency is much higher than that reported by simple protein incubation at non-reactive conditions. Therefore, the new methodology proposed here offers a valuable route for the synthetic reconstitution of native connector proteins in lipid bilayers, particularly in the membrane of giant unilamellar vesicles. The method is particularly convenient for efficient orthogonal integration of viral connectors as DNA portals in lipid vesicles and potentially transferable as a robust synthetic protocol adequate for the fabrication of highly specific DNA-pores in advanced nanotechnological applications.

METHODS

Chemicals. 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1-palmitoyl-2-azelaoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PAzPC), and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG) were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The dyes calcein and rhodamine-labeled dextran (40 kDa) were from Sigma, and FM1-43 was from Invitrogen. Solvents and other analytical grade chemicals were from Sigma. Deionized water was used from a Milli-Q source (resistivity higher than 18 M Ω /cm; organic content <2 ppb).

Connector Production. The connector complex was obtained from the protein p10 of *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 29. The gene coding for p10 was cloned in a recombinant plasmid pRSET-p10, which was overexpressed in *E. coli*. Protein p10 was purified by a two-step ion exchange chromatography, following the procedures described previously.²⁵ Protein p10 purified according to this protocol was found assembled as a dodecameric complex.²⁴

Buffer. All of the lipid/protein preparations were suspended/dissolved in saline buffer compatible with the p10-assembled configuration (50 mM TrisHCl, pH 7.8, 200 mM NaCl).

Large Unilamellar Vesicles. Large unilamellar liposomes (LUVs) were prepared by the extrusion method from mixtures of the three different lipids (DOPC, DOPG and PAzPC) in molar ratio 80:10:10. Lipids were dissolved in chloroform/methanol solution (1/1 v/v). This solution was later dried under a nitrogen stream forming a lipid film. Then, the film was hydrated by vortexing and further resuspension in buffer at 1 mg/mL total lipid concentration. The resulting multilamellar suspension was extruded through a polycarbonate membrane with 1 μm nominal pore diameter (Avestin, Germany). After 21 extrusion cycles, large unilamellar vesicles (LUVs) were obtained at high concentration and relatively low size polydispersity (as verified by DLS; data not shown). For protein incorporation, p10-lipid proteo-LUVs are formed by co-extrusion of the lamellar suspension with the protein solution. The protein was added during the hydration step before extrusion. Finally, LUVs (or proteo-LUVs) are concentrated at 10 mg/mL (45,000 rpm; 4 °C, 1 h).

Giant Unilamellar Vesicles (GUVs). These were prepared by the electrosweeling method from LUVs of the three different lipids (DOPC, DOPG and PAzPC; molar ratio 80:10:10). Briefly, 10 μL of LUV buffer dispersion (10 mg/mL total lipid) was spread in an ITO (indium tin oxide)-coated glass slide. The fabrication chamber is composed of two parallel slides separated by a Teflon spacer (1 mm thickness). After solvent evaporation, the film was rehydrated with a sucrose solution (300 mM). The chamber was then connected to an AC power supply (1.1 V, 8 Hz; 90 min). Calcein and rhodamine-dextran were used for fluorescence visualization of the vesicle lumen.

The soluble dyes were added to the sucrose solution (0.5 mM) just before the rehydration step. Vesicle suspensions are stored in the dark at 5 °C, remaining stable for several days.

Anti-p10 Immunofluorescence. The membrane reconstitution of p10 protein was probed by specific immunoassay using polyclonal anti-p10 antibody (AlexaFluor488-conjugated-anti-p10-IgG expressed in rabbit). Briefly, the IgG fraction was purified from 1 mL of bulk sera, raised against purified protein p10, using a G-sepharose column affinity chromatography. Then, 1 mg of IgGs was labeled with Alexa488 using the Invitrogen kit, AlexaFluor 488 labeling kit (ref A10235). An unspecific antibody, also expressed in rabbit, was used for negative control (AlexaFluor488-conjugated-anti-x-IgG). GUVs preparations were incubated overnight with the corresponding antibody dye. Prior to microscopy observation, in order to reduce fluorescence background arising from non integrated protein, the preparation was first washed out in excess saline buffer supplemented with glucose 308 mM and then centrifuged at 10,000 rpm for 2 min (Hettich Zentrifugen, Mikro 120).

Optical Microscopy. For microscopy observation, freshly made GUVs prepared at different compositions were transferred to a glucose (310 mM) solution. Fluorescence images were monitored under an inverted microscope in the fluorescence mode (Nikon Eclipse TE2000; 100 W Hg lamp; FITC and Texas Red filter sets) and recorded with a cooled CCD (Nikon DS-1QM, 14 fps, 1 megapixel).

LUVs for Confocal Microscopy. We used a confocal microscope Leica SP2 with a DMIRE 2 stage. Two different excitation lasers were used, Ar/ArKr (488 nm) and HeNe (543 nm) for emission in the green (calcein) and red (rhodamine) channels, respectively. Images were acquired and treated using the Leica Confocal Software (LCS). Extruded LUVs were prepared through polycarbonate membranes (1 μ m pore size) following the same protocol as above. Proteo-LUVs were prepared by lipid co-extrusion (16 mg/mL total lipid) with the protein solution in saline buffer (0.1 μ g/mL protein, 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 200 mM NaCl) in the presence of rhodamine-dextran (0.5 mM) and calcein (0.5 mM). For control, lipid LUVs were also prepared with internalized dyes in the absence of protein. To get optical contrast between the fluorescent inner lumen and the outer suspending medium, 5 μ L of proteoliposome suspension was diluted in 15 μ L of dye-free buffer solution (50 mM TrisHCl, 200 mM NaCl) and stored at 4 °C overnight.

Supported Planar Lipid Bilayers. A 40 μ L portion of 0.1 g/L LUV solution in 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.8) was incubated on a freshly cleaved mica surface for 1 h, resulting in the formation of a supported lipid bilayer as described in ref 34. The solution containing the nonfused lipid vesicles was removed and replaced by working buffer. Incomplete lipid bilayers were formed by reducing to a few minutes the time the mica surface was exposed to solution containing the lipid vesicles.

Atomic Force Microscopy. AFM images were taken with a microscope from Nanotec Electrónica SL (Spain) operated in the jump mode.³⁷ The scanning piezo was calibrated using silicon calibration grating (NT-MDT Moscow, Russia). Silicon nitride tips (Olympus) with a force constant of 0.05 N/m were used. To observe planar lipid bilayer structures on mica, LUV solutions were incubated as described above. Excess protein was removed from solution, and excess buffer was added before imaging. This protocol resulted in reproducible interaction of

the lipid bilayer to the mica surface. To analyze AFM images we used WSXM, a free software developed by Nanotec Electrónica SL (Spain).³⁸

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: monroy@quim.ucm.es.

Present Address

#Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), Campezo 1, Edificio 8, 28022 Madrid, Spain

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) del Gobierno de España. Comunidad de Madrid (CM). Universidad Complutense de Madrid/Banco Santander Central Hispano (UCM/BSCH).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Concepcion Revilla and Javier Dominguez (Dept. Biotechnology, INIA) for help in the preparation of fluorescently labeled antibodies. We thank Centro de Citometría-Microscopia de Fluorescencia (UCM) for confocal microscopy time and Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I (UCM) for the use of ultracentrifuges. This work was partly financed by MICINN under grants FIS2009-16450-C02-01 (to FM), BIO2008-04478-C03 (to M.V.), BFU2011-29038-C02-1 (to J.L.C.), CONSOLIDER CSD2007-00010 (to F.M., J.L.C., and M.V.), S2009/MAT1507 from CM (to F.M., J.L.C., and M.V.), and GR35/10-B-921539 from UCM/BSCH (to F.M.).

REFERENCES

- (1) Bustamante, C.; Bryant, Z.; and Smith, S. B. (2003) Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature* 421 (6921), 423–427.
- (2) Smith, D. E.; Tans, S. J.; Smith, S. B.; Grimes, S.; Anderson, D. L.; and Bustamante, C. (2001) The bacteriophage [phi]29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413 (6857), 748–752.
- (3) Sun, S.; Rao, V. B.; and Rossmann, M. G. (2010) Genome packaging in viruses. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20 (1), 114–120.
- (4) Carrascosa, J. L. (1986) *Electron Microscopy of Proteins*, Vol. 5, p 37–70, Academic Press, New York.
- (5) Johnson, J. E. (2010) Virus particle maturation: insights into elegantly programmed nanomachines. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20 (2), 210–216.
- (6) Steven, A. C.; Heymann, J. B.; Cheng, N.; Trus, B. L.; and Conway, J. F. (2005) Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (2), 227–236.
- (7) Valpuesta, J. M.; and Carrascosa, J. L. (1994) Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging. *Q. Rev. Biophys.* 27 (02), 107–155.
- (8) Cuervo, A.; Carrascosa, J. L.; Viral connectors for DNA encapsulation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011, (0).
- (9) Wikoff, W. R.; and Johnson, J. E. (1999) Virus assembly: Imaging a molecular machine. *Curr. Biol.* 9 (8), R296–R300.
- (10) Agirrezabala, X.; Martin-Benito, J.; Caston, J. R.; Miranda, R.; Valpuesta, J. M.; and Carrascosa, J. L. (2005) Maturation of phage T7

involves structural modification of both shell and inner core components. *EMBO J.* 24 (21), 3820–3829.

(11) Valpuesta, J. L. C. a. J. M. (1999) Bacteriophage connectors: structural features of a DNA translocating motor. *Recent Res. Dev. Virol.* 1, 449–465.

(12) Johnson, J. E., and Chiu, W. (2007) DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (2), 237–243.

(13) Orlova, E. V., Gowen, B., Droge, A., Stiege, A., Weise, F., Lurz, R., van Heel, M., and Tavares, P. (2003) Structure of a viral DNA gatekeeper at 10 Å resolution by cryo-electron microscopy. *EMBO J.* 22 (6), 1255–1262.

(14) Newcomb, W. W., Juhas, R. M., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Burch, A. D., Weller, S. K., and Brown, J. C. (2001) The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J. Virol.* 75 (22), 10923–32.

(15) Trus, B. L., Cheng, N., Newcomb, W. W., Homa, F. L., Brown, J. C., and Steven, A. C. (2004) Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 78 (22), 12668–71.

(16) Chang, J., Weigele, P., King, J., Chiu, W., and Jiang, W. (2006) Cryo-EM asymmetric reconstruction of bacteriophage p22 reveals organization of its dna packaging and infecting machinery. *Structure* 14 (6), 1073–1082.

(17) Jiang, W., Chang, J., Jakana, J., Weigele, P., King, J., and Chiu, W. (2006) Structure of epsilon15 bacteriophage reveals genome organization and DNA packaging/injection apparatus. *Nature* 439 (7076), 612–616.

(18) Wendell, D., Jing, P., Geng, J., Subramaniam, V., Lee, T. J., Montemagno, C., and Guo, P. (2009) Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores. *Nat. Nano* 4 (11), 765–772.

(19) Jing, P., Haque, F., Vonderheide, A. P., Montemagno, C., and Guo, P. (2010) Robust properties of membrane-embedded connector channel of bacterial virus phi29 DNA packaging motor. *Mol. Biosyst.* 6 (10), 1844–1852.

(20) Jing, P., Haque, F., Shu, D., Montemagno, C., and Guo, P. (2010) One-way traffic of a viral motor channel for double-stranded DNA translocation. *Nano Lett.* 10 (9), 3620–3627.

(21) Geng, J., Fang, H., Haque, F., Zhang, L., and Guo, P. (2011) Three reversible and controllable discrete steps of channel gating of a viral DNA packaging motor. *Biomaterials* 32 (32), 8234–8242.

(22) Fang, H., Jing, P., Haque, F., and Guo, P. (2012) Role of channel lysines and the “push through a one-way valve” mechanism of the viral DNA packaging motor. *Biophys. J.* 102 (1), 127–135.

(23) Guasch, A., Pous, J., Ibarra, B., Gomis-Rüth, F. X., Valpuesta, J. M., Sousa, N., Carrascosa, J. L., and Coll, M. (2002) Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage [phi]29 connector particle. *J. Mol. Biol.* 315 (4), 663–676.

(24) Valpuesta, J. M., Fernández, J. J., Carazo, J. M., and Carrascosa, J. L. (1999) The three-dimensional structure of a DNA translocating machine at 10 Å resolution. *Structure* 7 (3), 289–296.

(25) Ibanez, C., Garcia, J. A., Carrascosa, J. L., and Salas, M. (1984) Overproduction and purification of the connector protein of Bacillus subtilis phage phi 29. *Nucleic Acids Res.* 12 (5), 2351–2365.

(26) Davies, S. S., Pontsler, A. V., Marathe, G. K., Harrison, K. A., Murphy, R. C., Hinshaw, J. C., Prestwich, G. D., Hilaire, A. S., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (2001) Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J. Biol. Chem.* 276, 16015–16023.

(27) Fruhwirth, G. O., Loidl, A., and Hermetter, A. (2007) Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 718–736. Mattila, J. P., and Kinnunen PK, S. K. (2008) Oxidized phospholipids as potential molecular targets for antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (10), 2041–50.

(28) Khandelia, H., and Mouritsen, O. G. (2009) Lipid gymnastics: evidence of complete acyl chain reversal in oxidized phospholipids from molecular simulations. *Biophys. J.* 96 (7), 2734–2743.

(29) Karlsson, O., Rytömaa, M., Dahlqvist, A., Kinnunen, P. K. J., , A°., and Wieslander (1996) Correlation between bilayer lipid dynamics and activity of the diglyceroyldiacylglycerol synthase from *Acholeplasma laidlawii* membranes. *Biochemistry* 35, 10094–10102.

(30) Prenner, E., Sommer, A., Maurer, N., Glatter, O., Gorges, R., Paltauf, F., and Hermetter, A. (2000) Lateral microheterogeneity of diphenylhexatriene-labeled choline phospholipids in the erythrocyte ghost membrane as determined by time-resolved fluorescence spectroscopy. *J. Membr. Biol.* 174, 237–243.

(31) Sabatini, K., Mattila, J.-P., Megli, F. M., and Kinnunen, P. K. J. (2006) Characterization of two oxidatively modified phospholipids in mixed monolayers with DPPC. *Biophys. J.* 90, 4488–4499.

(32) Boal, D. H. (2005) *Mechanics of the Cell*, 3rd ed., p xiv, Cambridge University Press, New York.

(33) Phillips, R., Ursell, T., Wiggins, P., and Sens, P. (2009) Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* 459 (7245), 379–385.

(34) Nagle, J. F., and Tristram-Nagle, S. (2000) Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 159–195.

(35) Z. V. Leonenko, E. F., Ma, H., Dahms, T. E. S., and Cramb, D. T. (2004) Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. *Biophys. J.* 86, 3783–3793.

(36) Richter, R., Mukhopadhyay, A., and Brisson, A. (2003) Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. *Biophys. J.* 85 (5), 3035–3047.

(37) Moreno-Herrero, F., de Pablo, P. J., Fernandez-Sanchez, R., Colchero, J., Gomez-Herrero, J., and Baro, A. M. (2002) Scanning force microscopy jumping and tapping modes in liquids. *Appl. Phys. Lett.* 81 (14), 2620–2622.

(38) Horcas, I., Fernandez, R., Gomez-Rodriguez, J. M., Colchero, J., Gomez-Herrero, J., and Baro, A. M. (2007) WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* 78 (1), 013705–8.

(39) Alberts, B. (2002) *Cell Biology Interactive*, 4th ed., Garland Science, New York.

(40) Tamba, Y., Ohba, S., Kubota, M., Yoshioka, H., Yoshioka, H., and Yamazaki, M. (2007) Single GUV method reveals interaction of tea catechin (–)-epigallocatechin gallate with lipid membranes. *Biophys. J.* 92 (9), 3178–3194.

(41) Betz, W. J., Mao, F., and Smith, C. B. (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 365–371.

(42) Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J., and Ram, S. J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* 11 (7), 36–42.

(43) Brian, A. A., and McConnell, H. M. (1984) Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6159–6163.

(44) Lopez-Montero, I., Arriaga, L. R., Monroy, F., Rivas, G., Tarazona, P., and Velez, M. (2008) High fluidity and soft elasticity of the inner membrane of *Escherichia coli* revealed by the surface rheology of model langmuir monolayers. *Langmuir* 24 (8), 4065–4076.

Permeability modes in fluctuating lipid membranes with wide DNA pores

Lara H. Moleiro,^{1,2} Michael Mell,¹ Rebeca Bocanegra,³ Iván López-Montero,¹ Peter Fouquet,⁴ Thomas Hellweg,⁵ José L. Carrascosa³ and Francisco Monroy^{1,*}

¹*Departamento de Química Física I, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain, EU*

²*Physikalische Chemie I, Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, D95447 Bayreuth, Germany, EU*

³*Departamento de Estructura de Macromoléculas, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, E28049 Cantoblanco, Spain, EU*

⁴*TOF/HR Group, Institut Laue Langevin, 6 rue Jules Horowitz, BP156, F38042 Grenoble Cedex 9, France, EU*

⁵*Physikalische und Biophysikalische Chemie I, Universität Bielefeld, Universitätsstraße 25, D33615 Bielefeld, Germany, EU*

* Corresponding author: monroy@quim.ucm.es. Correspondence address:

Department of Physical Chemistry, Complutense University, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. Spain. Tel.: (34) 91 394 4128, Fax: (34) 91 394 4135

Introduction

Protein pores are found in cell membranes where they act as natural permeability channels for transporting ions or hydrophilic molecules across the hydrophobic barrier constituted by the lipid membrane [1, 2]. Such a permeability transport constitutes an energy-dissipating process which generates forces on the membrane where the pores are supported [3]. Because the pores produce transversal transport of mass across the membrane normal they induce additional fluctuations whose local strength is determined by the local density of pores in each emplacement in the membrane. The dynamics of the process is driven by the absolute pore permeability, and occurs in a time scale dominated by the permeability kinetic coefficient (λ) but limited by the lateral diffusion coefficient of the protein in the bilayer (D). Consequently, since biological membranes are quite flexible under thermal fluctuations, a given distribution of permeable pores provide with an extra source of non-thermal noise giving rise to additional membrane fluctuations [4]. Ionic channels represent the prototypical case of narrow pore with a high specificity for the transported species [5]. Alternatively, antibiotic peptides constitute other family of membrane pores with a wider chemical specificity. In the two cases, the pore is constituted by a single protein chain which assembles inside of the hydrophobic interior of the lipid bilayer to constitute a sinuous cavity able to

form the elongated channel needed to span the whole membrane. These narrow pores are uniquely able to transport small monovalent ions and some divalent cations, although they are essentially impermeable to large ions with extended hydration shells which cause the pore blockage at the entrance of the channel.

Using this generalized structural principle, cells have evolved wider channels to facilitate membrane transport of larger hydrophilic metabolites -such as sugars and aminoacids [5]. In general, these monolithic pores are constituted by single protein molecules forming sinuous channel which are filled with water molecules, almost all of which must be displaced when an ion is transported so establishing a bimolecular flow of ion and water molecules known as flux coupling [6]. In contrast, scaling pore-mediated transport up to higher macromolecular sizes stems on different structural principles which require the assembly of multimeric protein complexes working as sophisticated nanomachineries. In the case of nucleic acid polymers, for instance, these gating motors have to overcome a number of basic problems for efficient translocation of the extended macromolecule. Mainly derived from the charged nature of the polynucleotide molecules, as well as from their high intrinsic rigidity [7], these multimeric pores organize as conformational flexible structures able to accommodate the high topological variability of the transported macromolecule across the translocation process. An interesting example for double stranded DNA translocation through an active macromolecular pore is given by the packaging of the genome in bacteriophages [8]. The DNA packaging machinery in phages is located at a unique vertex of the prohead (the portal) and comprises the head-tail connector and the terminases, which are involved not only in the selection of the DNA to be packaged but also in the ATP-driven DNA translocation [9]. In the phi29 bacteriophage, the packaging complex, or portal, is formed by the assembly of connector and terminases defining a hollow channel, slightly larger than the one of dsDNA. The connector is a multimeric complex formed by self-assembly of identical p10-protein units. In phi29, the monomers assemble in a propeller-like dodecamer with an external diameter of 14.6nm and a height of 7.5nm [10]. The dodecamer forms an axysymmetric structure with a stalk and a wing structural domain, which also shows a conspicuous wide channel ($\phi = 3.5$ nm diameter) that runs along the axis of the particle [**Error! Bookmark not defined.**]. In a recent work [11], we reported on an efficient synthetic route for the orthogonal integration of the pre-assembled connector of the native p10 protein of phi29.

Here, following the integration procedure described in ref. [11], we have prepared p10-pored lipid vesicles and we have tested for enhanced water permeability of the membrane in different osmotic fields. To this purpose, we took advantage of the thermal shape fluctuations of the pored membranes in the vesicle configuration. Optical video-microscopy techniques provided us with a powerful method to assess membrane dynamics by direct observation of the curvature undulations in giant unilamellar vesicles (GUVs) [12, 13]. From flickering spectroscopy not only the spectral density but the relaxation dynamics of the fluctuation modes can be

determined. This allowed us to unequivocally determine the dynamical impact of average membrane permeability on membrane motions. From the spectral density of the static structure factor measured at a macroscopic scale, at wavevectors smaller than the characteristic pore size ($q \ll \phi^{-1}$), we determined the presence of permeability motions and measured the surface density of the membrane pores. Neutron spin echo (NSE) has been alternatively exploited to explore microscopic permeability at the single-pore level. Indeed, NSE provides the adequate q -range to quantitatively probe fast membrane dynamics over small lengths ($q \approx \phi^{-1}$) in nanometer-sized vesicles. For that experiments, we considered large unilamellar vesicles (LUVs) prepared by extrusion, which are comparatively smaller and monodisperse than GUVs, a realization clearly advantageous in order to optimize observations in a statistical ensemble average. In the next section we describe the minimal theory needed to rationalize how the dynamics of bending fluctuations is affected by pore permeability in an elastic lipid bilayer.

Theory

In deformable membranes, the height fluctuations $h(\mathbf{r},t)$ are described by the usual Canham-Helfrich (CH) hamiltonian which accounts for the Hookean energy of the bending/tension modes (1). In the presence of membrane pores, an additional strain field accounting for the local imbalance of permeability might be considered, $\phi(\mathbf{r},t) = [\rho^\uparrow(\mathbf{r},t) - \rho^\downarrow(\mathbf{r},t)]/\rho_0$, which is defined as the local difference between the surface density of pores transferring mass outwards $\rho^\uparrow(\mathbf{r},t)$ and the density of them transferring mass backwards $\rho^\downarrow(\mathbf{r},t)$ (here, the superscript \uparrow indicates transport from inside to outside the membrane whereas \downarrow indicates the contrary sense of permeation). Here, ρ_0 is the average surface density of membrane pores inserted in the membrane, $\rho_0 = \langle \rho^\uparrow(\mathbf{r},t) + \rho^\downarrow(\mathbf{r},t) \rangle$, thus making the definition of the imbalance field $\phi(\mathbf{r},t)$ with a dimensionless form. For this problem, Manneville et al. (2) proposed an extension of the CH-hamiltonian as:

$$dF[h, \phi] = \frac{1}{2} \left[\sigma (\nabla h)^2 + \kappa (\nabla^2 h)^2 + \chi(F_p) \phi^2 - 2w\Xi(\nabla^2 h) \phi \right] dA \quad (1)$$

The two first terms in Eq. (1) account for the usual CH-contributions from surface tension (σ) and bending elasticity (κ being the "bare" bending modulus). The third term in the rightmost hand of Eq. (1) accounts for the additional energy due to local net permeation, which is described as a hookean contribution from the imbalance strain. Although slightly different by the definition of the dimensionless strain ϕ , this harmonic term here equivalent to the one introduced by Manneville et al. to describe the permeation imbalance (those authors defined the strain field as $\psi(\mathbf{r},t) = \rho_0 \phi(\mathbf{r},t)$) [14]. Within this model, the linear susceptibility $\chi(F_p)$ might arise from the elementary force per area unit, F_p , transmitted by a pore to the membrane in a steady permeation event. A coupling term locally linking permeability imbalance with local curvature was additionally taken into account by Manneville et al. [13].

Such a coupling energy is the fourth term in the rightmost side of Eq. (1), which is treated as an hybrid oscillator characterized by a coupling constant Ξ that accounts for the decrease in mechanical energy occurred upon membrane permeation (expressed in units of energy per unit area). The curvature-permeation coupling expressed within this term is assumed to scale with membrane thickness, w , the relevant dimensional parameter that defines the strength of the mechanical coupling between the transverse deflection and the longitudinal strain [15]. The negative sign of the coupling term is chosen in a way such that pores placed in membrane invaginations ($\nabla^2 h < 0$) contribute to stabilize net flow inwards ($\phi < 0$) and, conversely, net flow inwards is elicited within membrane protrusions. In other words, the coupling term in Eq. (1) represents a stabilizing contribution which can be interpreted either as a reduction of the permeation energy due to pore closure upon increasing curvature (seen as an effective decrease in permeation susceptibility, *i.e.* $\chi_{eff} = \chi - 2w\Xi |(\nabla^2 h)/\phi| < \chi$), or alternatively, as an "active" component causing effective membrane softening due to the reaction force stressed by open pores on the membrane after each permeation event occurs (upon increasing permeation, the effective bending modulus decreases below its bare value as $\kappa_{eff} = \kappa - 2w\Xi |\phi/(\nabla^2 h)| < \kappa$). By considering an elasticity-permeability Hamiltonian equivalent to Eq. (1) within the fluctuation-dissipation formalism (ref), the analytic expression for the spectral amplitudes of the thermal fluctuations were previously obtained in ref. [13]. Following the detailed k -space calculation described by Manneville et al [13], using our notation, for the membrane fluctuations with wavenumber k , in the relevant permeation regime one gets:

$$\langle h_k^2 \rangle \approx \frac{k_B T}{\sigma k^2 + \kappa_{eff}^{(\Xi)} k^4} + \frac{k_B T w (w\chi - \Xi)}{\left(\sigma + \kappa_{eff}^{(\phi)} k^2 \right) \left(\sigma + \kappa_{eff}^{(\Xi)} k^2 \right)} \quad (2a)$$

where two effective bending moduli are involved:

$$\begin{aligned} \kappa_{eff}^{(\Xi)} &= \kappa - w^2 \Xi \\ \kappa_{eff}^{(\phi)} &= \kappa - 2w^2 \Xi - \frac{w^2 \Xi^2}{\chi} \end{aligned} \quad (3)$$

The shape-permeation spectrum in Eq. (2) describes amplified fluctuations for the pored membranes in the bending dominated regime at high wavevectors. In this regime, the effective bending constant is effectively decreased by permeation, resulting in effectively softened fluctuations accumulated with the "active" fluctuations arising from pore permeation. Consequently, in the effective non-permeation case ($\chi = \Xi = 0$, so $\kappa_{eff}^{(i)} = \kappa$), the usual Helfrich spectrum for the deformable membrane is recovered:

$$\langle h_k^2 \rangle_0 \approx \frac{k_B T}{\sigma k^2 + \kappa k^4} \quad (2b)$$

To complete the theoretical frame, the permeability transport must be considered

within the evolution equations for the two relevant strain fields, h and ϕ . On the one hand, for the deformation field h , the corresponding Langevin equation reads as:

$$\frac{\partial h}{\partial t} = \Lambda_t \left(\frac{\delta F}{\delta h} \right) + \lambda \left(\Delta \Pi + \rho_0 F_p \phi + \rho_0 F'_p \nabla^2 h \right) + \xi_{th} \quad (4)$$

In this dynamic equation, Λ_t stands for the hydrodynamic compliance (Oseen tensor) accounting for the transverse component of the viscous flow field (with transverse stress $f_z = -\delta F/\delta h$). In this case, the hydrodynamic tensor is determined by a balance between permeability and frictional drag (in k -space, $\Lambda_t(q) = \lambda + (4\eta k)^{-1}$, with λ being the permeability coefficient and η the bulk viscosity of the solvent). The hydrodynamic flow in the left hand of Eq. (2) is equaled to the sum of the flow field describing a permeation stream across the membrane ($\sim \lambda \Delta \Pi$; which is driven by differences in osmotic pressure $\Delta \Pi$ [13] plus the local force exerted by the permeation imbalance ($\sim \rho_0 F_p \phi$) plus a crossed term describing the sensitivity of the permeation force to curvature ($\sim \rho_0 F'_p \nabla^2 h$) and finally, the stochastic thermal fluctuations ξ_{th} , described as a Brownian noise projected on the transverse direction, *i.e.* $\langle \xi_{th}(t) \xi_{th}(t') \rangle = 2k_B T \Lambda_t(k) \delta(t-t')$.

On the other hand, the corresponding transport equation for the imbalance field ϕ is written as:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = \Lambda_l \left(\frac{\delta F}{\delta \phi} \right) + \zeta_{th} \quad (5)$$

where Λ_l stands for the longitudinal component of the Oseen tensor; in this case $\Lambda_l = D/\chi$ (2), with D being the lateral diffusion coefficient of the pore inserted in the membrane. The last term corresponds to a longitudinal stochastic field with correlations $\langle \zeta_{th}(t) \zeta_{th}(t') \rangle = 2k_B T \Lambda_l(k) \delta(t-t')$.

These two equations (Eqs. (4-5)) describe the dynamics of two elemental processes at two different time scales: *a*) transverse fluctuations $h(k,t)$, which are described as curvature deflections essentially driven by membrane tension and bending elasticity (although somewhat affected by pore permeability) and, *b*) longitudinal transport of pores $\phi(k,t)$, which determines the time scale at which pore density fluctuations can modify the distribution of permeable "active spots" along the membrane. When solutions are found as planar waves, in the case that the osmotic gradient was locally balanced by pore permeability, *i.e.* $\Delta \Pi \approx -\rho_0 F_p \phi$, for the curvature mode one expect relaxation at a rate [13]:

$$\omega_h \approx \left(\lambda + \frac{1}{4\eta k} \right) \left(\sigma k^2 + \kappa_{eff}^{(\Xi)} k^4 \right) + \rho_0 \lambda F'_p k^2 \quad (6)$$

which recovers the usual form $\omega_h \approx (\sigma k + \kappa k^3)/4\eta$ for pure tension-bending modes in an elastic membrane with a low permeability ($\lambda \approx 0$).

For the slower protein-diffusivity mode, one expects [13]:

$$\omega_{\phi} \approx \Lambda_i \chi k^2 \approx Dk^2 \quad (7)$$

Consequently, for large protein pores ($D < 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$), one expects diffusional relaxation rates too much slow to be detected in the experimentally accessible time window ($\tau_{\phi} \gg 1\text{s}$ for flickering spectroscopy in GUVs at $k \approx 1\mu\text{m}^{-1}$; $\tau_{\phi} > 100\mu\text{s}$ for NSE). In the present case with connector pores, the lateral diffusivity of the protein is extremely slow, thus remaining systematically non-relaxed in the experimental time window.

Other relevant time scale is determined for permeability motions. In an osmotic gradient $\Delta\Pi$, the stationary flow through the pores is expected with a rate, $r_{st} \approx \lambda\Delta\Pi/w$. Additionally, local accumulations of pores, as those driven by the curvature-coupling process considered above, are expected to strongly influence the shape fluctuations with permeability motions; in this case, the permeation rate is expected to increase by a k -dependent amount r_{ϕ} which is essentially determined by the density fluctuation field ϕ [13]. Therefore, the permeability transport of molecules through the pores occurs with a net rate:

$$\tau_p^{-1} \approx r_{st} + r_{\phi} \approx \lambda \frac{\Delta\Pi}{w} + \rho_0 \frac{w\Xi}{\chi} \lambda F_p q^2 \quad (8)$$

which is increased above the steady value r_{st} by the "active" component r_{ϕ} due to the reaction force involved in the permeability event.

Materials and Methods

Chemicals: *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* (DOPC), *1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)* (POPG) and *1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* (PAZPC) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) at 99% purity and cholesterol from Sigma. Lipids are stored at -20°C and used as received without further purification. Ultrapure de-ionized water was obtained from a Milli-Q source (resistivity higher than $18 \text{ MOhm} \times \text{cm}$; organic matter content $< 5 \text{ ppb}$). Deuterated water from Sigma (99.9%) was used in NSE and DLS experiments as a dispersion solvent ($\eta = 1.2010 \text{ MPa} \times \text{s}$ at 22°C). Ethanol, chloroform and other solvents were from Sigma-Aldrich.

Sample Preparation: A synthetic method for the orthogonal integration of the phi29 connector in lipid bilayers was reported in ref.[11]. In that efficient method, the native connector is incubated with the lipid membranes in the presence of oxidized lipids susceptible to react with the equatorial belt of arginine residues exposed at the outer surface of the connector protein. The guanidinium group of arginine (pK 13.6) was positively charged in acidic, neutral, and even most basic environments. Because of the conjugation between the double bond and the nitrogen lone pairs, the positive charge was delocalized, enabling the formation of stable intermediates by multiple hydrogen bonding responsible for the extreme

basicity of guanidine against carboxylic acids. Consequently, exposed arginine residues of p10 exhibit a strong reactivity against carboxylated lipids in moderately basic (pH 8) aqueous solution. Therefore, in the present work we doped the membranes with a small amount of PAzPC, an oxidized lipid with the short saturated chain (C0:9) tailored with a carboxylic acid group. The membrane composition was chosen DOPC/POPG/PAzPC with a proportion 80/10/10 per cent molar, a formulation enabling sufficient p10 reactivity with a maximum of structural flexibility and lateral fluidity. Lipids were mixed at proportion and dissolved in chloroform/methanol (3/1) mixture.

Giant unilamellar vesicles: GUVs were prepared by the electro-formation method invented by Angelova [16] using the optimised protocol described by Mathivet et al. [17]. The precursor lipid film is prepared as described above for preparing LUVs.

Large unilamellar vesicles: LUVs were prepared by the extrusion method using a commercial mini-extruder (Avanti Polar Lipids). For avoiding possible differences between DLS and NSE experiments we always used D₂O as aqueous solvent. For preparing vesicles, the blend of POPC and cholesterol is first dissolved in chloroform/methanol mixture (2:1). Later, the solvent is slowly removed by evaporation in a dry nitrogen stream, yielding a homogenous lipid film, consisting of multiple lamellae. Then the lipid film is hydrated by pouring the aqueous phase. During the hydration phase (1h) the dispersion is frequently vortexed and maintained above the melting temperature of the lipid mixture ($T_m \sim 3^\circ\text{C}$, in the present case). Then, this lipid suspension is extruded through a polycarbonate filtering membrane with a defined pore size (Whatmann; 100 nm pore size), producing unilamellar vesicles with a diameter near the pore size. Extrusion is performed at temperature well above T_m . Ten extrusion cycles ensure a homogeneous dispersion of LUV's with a constant size and low polydispersity [18-20]. The dispersion was then filtered through a 0.2 μm teflon filter and poured into quartz tubes.

Neutron Spin Echo (NSE): Scattering methods provide a powerful tool to probe experimentally the relaxation dynamics of thermal fluctuations (3). NSE is adequate for studying the relaxation dynamics of the curvature undulations in the regime of high wavevectors where fluctuations are short as compared to vesicle dimensions ($qR \gg 1$; being q the 3D-scattering wavevector and R the vesicle radius). For dilute dispersions of fluctuating vesicles, the NSE intermediate scattering function is expected with the form:

$$S(q,t)/S(q,0) = g_T(t) \left[A_q + (1 - A_q) g_{fluct}(t) \right] \quad (9)$$

which describes the relaxation dynamics of the fluctuating elastic shell undergoing diffusional translation [21].

In this expression, the membrane fluctuations are considered internal motions coupled to translation. Since NSE lead to normalized functions both components

sum up to unity, *i.e.* $0 < A_q < 1$. Assuming that the sub- μ s dynamics probed by NSE corresponds to the membrane undulations much faster than the bare diffusional translation ($\Gamma_{fluct} \approx t_{NSE}^{-1} \gg \Gamma_T$), both motions, translation and shape undulations, can be considered essentially decoupled at the NSE window. In the present study, the vesicles prepared are 100nm sized, thus the translational motion is non-relaxed at the q -window probed in NSE experiments, thus $g_T(t) \approx \exp(-\Gamma_T t) \approx 1 - o(\Gamma_T t)$ (if $qR \gg 1$). Consequently, Eq. (10) can be approximated as a linear combination of two uncoupled exponential decays:

$$S(q,t)/S(q,0) \approx A_q \exp(-\Gamma_T t) + (1 - A_q) g_{fluct}(t) \quad (10)$$

with a translational decay rate governed by the translational diffusion coefficient of the vesicle D_T , this is:

$$\Gamma_T(q) = D_T q^2 \quad (11)$$

For dilute dispersions, diffusional translation is essentially governed by Stokes friction, thus D_T is determined by the hydrodynamic radius of the vesicle R_h through the Stokes-Einstein relationship:

$$D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (12)$$

where k_B is the Boltzmann's constant and η the bulk viscosity of the medium.

In practice, translational effects can be adequately unfolded by fixing D_T at the value obtained from auxiliary dynamic light scattering experiments (DLS) [21, 22]. The approximated expression in Eq. 11 has been successfully used for fitting experimental NSE relaxation curves. The reported NSE experiments were done on the IN15 instrument at the ILL, Grenoble [23]. This instrument provides the longest Fourier times, currently available at NSE instruments. The samples are poured into quartz cells (1mm thickness; Hellma). The instrument was equipped with a thermostated holder for these cells and all measurements were done at a temperature of 22°C. A Fourier time range up to 170 ns was explored at different q -values from 0.119 nm⁻¹ to 1.102 nm⁻¹. To achieve this, measurements at a wavelength of $\lambda = 12\text{\AA}$ and 15\AA had to be performed. The wavelength distribution in both cases had a FWHM of $\Delta\lambda/\lambda = 0.15$.

Dynamic light scattering: DLS measurements were carried out in the ILL Soft Matter Partnership Lab (PSCM@ILL). Measurements have been performed using an ALV CGS-3 DLS/SLS Laser Light Scattering Goniometer System (ALV GmbH Langen, Germany). This instrument allows for a simultaneous measurement of static and dynamic light scattering in an angular range from 25° up to 155°. It is equipped with a HeNe laser operating at a wavelength of 633nm with a power of 22mW. An ALV/LSE-5004 Light Scattering Electronics is used together with a ALV-7004 Fast Multiple Tau Digital Correlator. For DLS measurements, a small

aliquot of the same vesicle suspension prepared for NSE experiments is diluted in D₂O (1:10 v/v). DLS (0.2mg/mL) and NSE (2mg/mL) experiments were indeed performed with the same vesicle suspension, DLS running immediately before NSE beamtime. The samples are poured into quartz cells (10mm O.D., Hellma). Then, they were placed in the measurement cell which is filled with decaline to match the refractive index of the quartz sample cells. Temperature inside this cell is measured by a Pt-100 sensor and kept constant at 25.0°C with a precision of ± 0.1 degrees. No shape fluctuations exist at wavevectors smaller than the vesicle size, $qR < 1$. Thus, in this regime, the diffusive frequencies obtained by CONTIN must correspond to pure translational motion, $\Gamma_T(q) = D_T q^2$. Consequently, the hydrodynamic size of the suspended vesicles can be easily obtained by fitting the translational relaxation frequencies extracted from the DLS data to Eq.8 in the low- q limit. Within this approach, the distribution bandwidths are related with the size polydispersity as $\sigma_R = \Delta R/R = \Delta \Gamma_T / \Gamma_T$.

Results

Flickering spectroscopy in GUVs.

The static spectra reveal effective softening due to membrane permeability. Figure 1 shows the amplitude spectra of the equatorial fluctuations of giant unilamellar vesicles of the bare lipids (see inset as Fig. 1b) and their comparison with the case of pored vesicles. The spectral analysis provides us with the experimental values of the mechanical parameters. This is performed in terms of the static spectrum (see Eq. 2) particularized to the equatorial modes (with wavenumber $k = l/R$, $l = 2, 3, 4, \dots$ and R being the vesicle radius). For the bare membrane (DOPC/POPG/oxPazPa (8:1:1)), using Eq. 2a, these values are $\kappa = (7.5 \pm 0.8) \cdot 10^{-20}$ J = $(18 \pm 2) k_B T$ and $\sigma = (5 \pm 3) \cdot 10^{-6}$ N/m (with absolute errors corresponding to the standard deviation calculated over a population of $N = 30$ vesicles). This result assigns the bare lipid membrane with a relatively high bending rigidity, typical of most phospholipids in the fluid state (4, 5). The surface tension is affected by a large variance which is intrinsically due to the natural variability in excess areas of the vesicles fabricated by the electrosweeling method. Its absolute value is found quite high ($\sigma \approx 5 \cdot 10^{-6}$ N/m), as compared with GUVs of neutral lipids ($\sigma \approx 10^{-8} - 10^{-7}$ N/m, typically a fact probably related with the presence of the charged lipid (POPG) in the present formulation (6). The presence of p10 protein causes deep changes in the fluctuation spectra with respect to the non-pored reference membrane. First, the fluctuations strongly boost up with increasing protein concentration. This change is measurable as an increase of the spectral amplitudes, by nearly two orders of magnitude at the lowest wavevectors. Second, a marked change is observed in the spectral decays. Although a regular decay is observed at low wavevectors, a near-constant tail is reached at high wavevectors. Such a high amplitude level of the high- k modes corresponds to enhanced high-curvature

fluctuations, which have no explanation in the context of the regular Helfrich spectrum (see Eq. 2b). Third, the amplitude of the non-decaying tail is strongly dependent on the protein concentration, a fact clearly pointing to a correlation between permeability-mediated motions and the absolute level of the high- k fluctuation. Finally, a strong increase of the level of noise is detected with increasing protein. Therefore, these experimental spectra can be described by the extended expression in Eq. 2a accounting for permeability motions that superposed to the regular tension-bending modes produce an enhancement of the membrane fluctuations. Fits to Eq. 2a over the whole range of wavevectors are only possible by fixing $w = 4\text{nm}$ [11] and $\kappa_{\text{eff}}^{(\phi)} = 0$, and with the two moduli (σ , $\kappa_{\text{eff}}^{(\Xi)}$) and the amplitude ($w\chi - \Xi$) as adjustable parameters.

The dependence of the adjustable parameters on the protein concentration is shown in Fig. 1c (σ) and Fig. 1d ($w\chi - \Xi$). A remarkable strong decrease, by five orders of magnitude, is detected in the membrane tension (Fig. 1c), which suggests not only protein integration but strong interaction with the membrane. Furthermore, the permeation amplitude ($w\chi - \Xi$) increases roughly linear (within its large errors) with the protein concentration (see Fig. 1d), as expected. From the slope, the elemental energy corresponding to the permeation event has been estimated, $E_{\text{perm}} = (w\chi - \Xi)/\rho \approx 15 k_B T$ per pore (see Fig. 1d. No dependence on the protein concentration is detected (within the fitting error) for the effective bending modulus; in this case, we obtain $\kappa_{\text{eff}}^{(\Xi)} = (2 \pm 1)k_B T$, independently of the protein concentration. Since $\kappa_{\text{eff}}^{(\Xi)} \approx 2k_B T$, in comparison with $\kappa \approx 18k_B T$, using Eq. 3, one estimates $\Xi \approx 1k_B T/\text{nm}^2$. The fact that as the membrane tension as the effective moduli ($\kappa_{\text{eff}}^{(\Xi)} \ll \kappa$ and $\kappa_{\text{eff}}^{(\phi)} \approx 0$) were strongly reduced indicates a strong softening upon protein integration. Even if such a material softening contributes itself to the increase of the fluctuation amplitudes, however, the non-decaying high- k tail in the experimental spectra (see Fig. 1a) is explained as due to the net permeation term in Eq. 2a. Such enhanced fluctuations are detected in the regime of high wavevectors, just where bending modes might prevail over tension-mediated fluctuations. However, in the present case the two effective bending moduli effectively vanish, so $\sigma \gg \kappa_{\text{eff}}^{(i)} k^2$, even at high k . Consequently, due to effective softening caused by protein ($\kappa_{\text{eff}}^{(i)} \rightarrow 0$), the permeation contribution in the second term of Eq. 2a becomes essentially constant which explains the non-decaying tail at a high- k level $\langle h^2 \rangle_{\text{perm}} \approx k_B T w (w\chi - \Xi) / \sigma^2$.

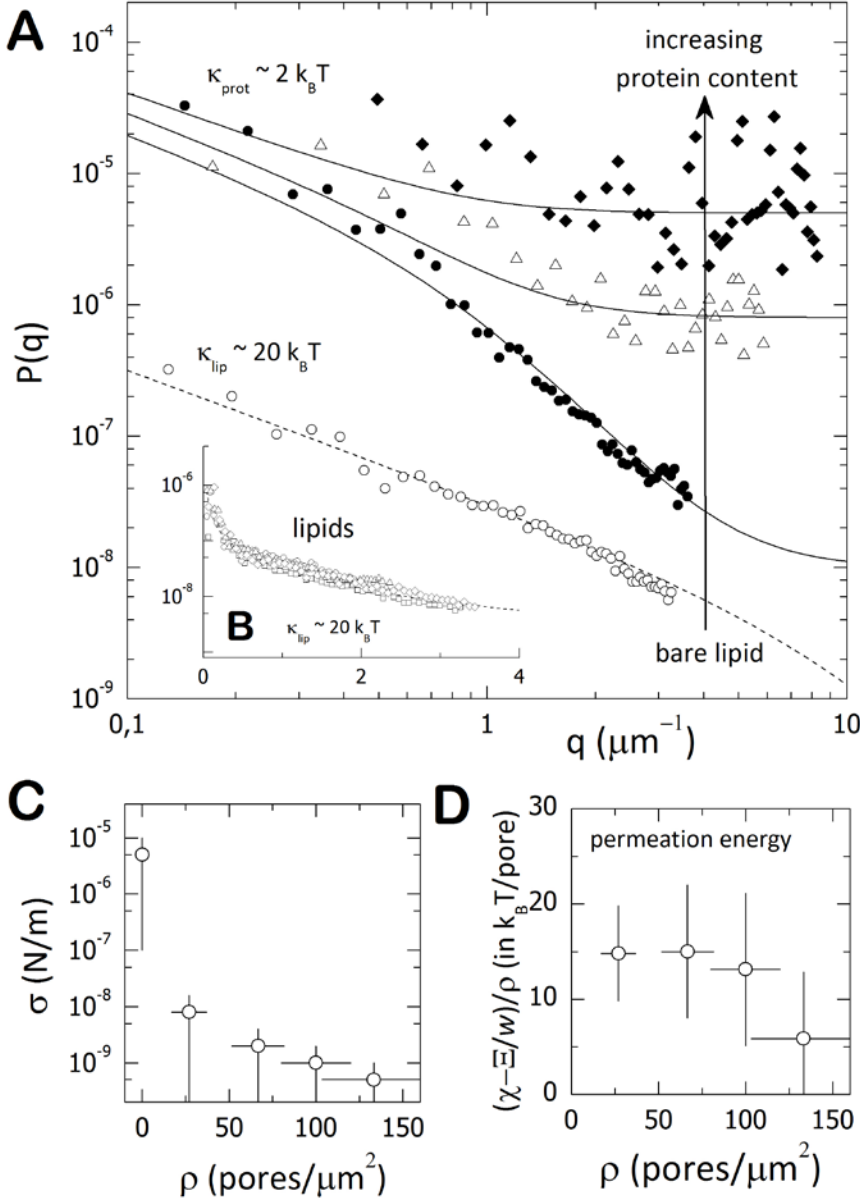


Figure 1. A) Fluctuations Spectrum for vesicles composed only of lipid (\circ), and vesicles with different concentrations of p10 (ratios P / L: 1:37000, 1:15000 and 1:7500). (B) Spectrum Control fluctuations for several vesicles composed only by lipid. (C) Voltage dependence of the density of pores in the membrane. (D) Permeation susceptibility as a function of the density of pores.

Enhanced permeability fluctuations increase upon higher concentration gradients.

In order to verify the permeation nature of the enhanced fluctuations, we performed additional experiments with pored membranes subjected to increasing concentration gradients of permeable solute. We fixed the protein concentration (constant pore density thus constant permeability) but increased the concentration of glucose in the outer medium. The results are shown in Figure 2 for the fluctuation spectra. Whereas the non-pored membrane is quite insensitive to the sugar gradient, the pored membrane undergoes increasingly larger fluctuations with increasing the osmotic gradient. This result points out the control of the permeability transport upon the fluctuations of the membrane containing the p10-protein which, obviously, is functioning as a pore permeable to glucose and water. Such a molecular transport is bidirectional, composed by the diffusion of glucose inside the diluted lumen of the vesicle and an osmotic outflow of water outwards the hypertonic outer medium. Because a molecular imbalance is produced in each permeability event, an effective force appears resulting in an apparently active process, which enhances the amplitude of the membrane fluctuations above the level of the thermal noise. Consequently, the higher the gradient, the higher is the permeation susceptibility χ , which neatly results in an increasing spectral tail with increasing gradient (see Fig. 2).

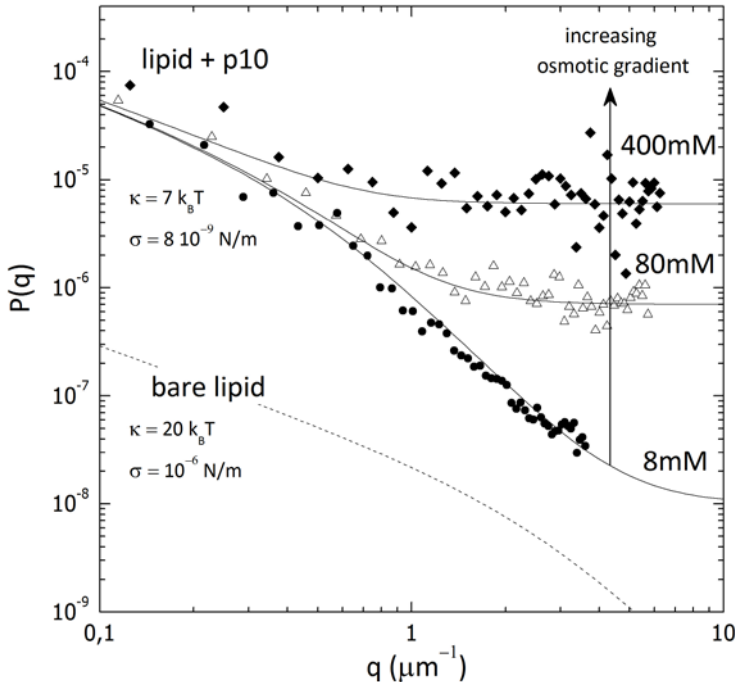


Figure 2. Fluctuation spectrum for vesicles with p10 at a ratio P / L 1/37000 exposed to various osmotic gradients (8 mM, 80 mM and 400mM).

Correlation function: dynamic crossover to the permeability regime. For the sake of example, Figure 3a shows the height-to-height autocorrelation functions obtained from the flickering time series for the equatorial modes of fluctuation. Their relaxation is reasonably described by a single exponential decay, from whose fits the relaxation rates of the fluctuation modes are obtained. Figure 3b shows the k -dependence of the experimental rates, which are found in good quantitative agreement with the theoretical prediction for tension/bending modes in a flexible membrane with a low permeability, this is $\omega_h(\lambda=0) \approx (\sigma k + \kappa k^3)/4\eta$ (with $\sigma = 5 \cdot 10^{-6}$ N/m and $\kappa = 18k_B T$, the values obtained from the static spectra of the bare lipid membrane).

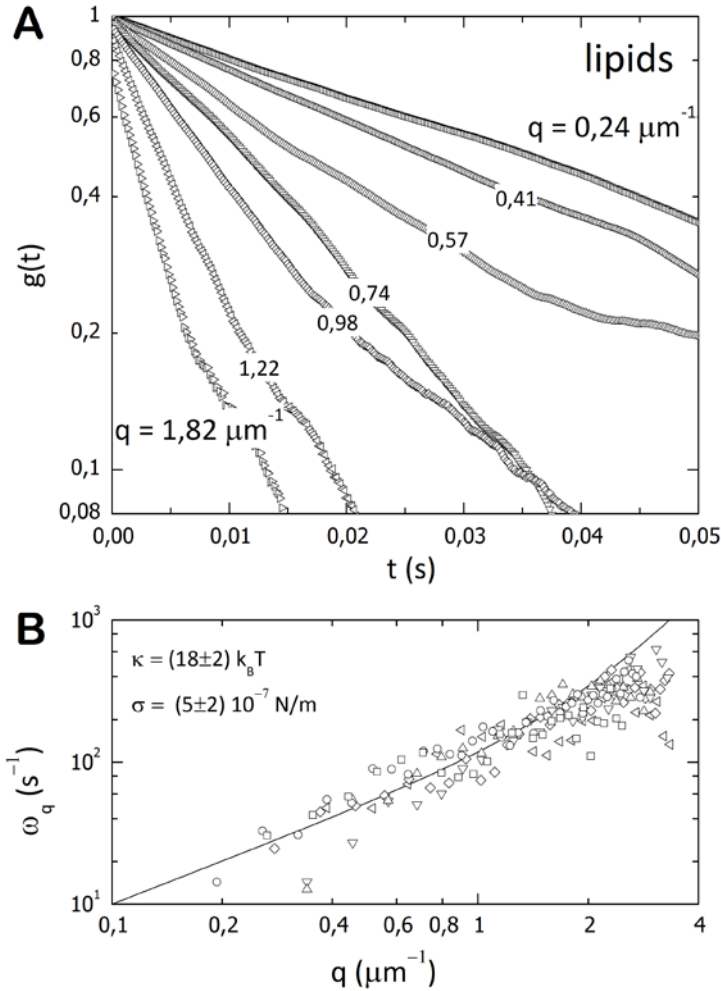


Figure 3. A) Correlation Function for control vesicle without pores, B) Dynamic results for 5 control vesicles without pores.

In parallel with the static case, we analyzed the autocorrelation functions corresponding to the pored vesicles. Figure 3c shows the relaxation rates obtained at different protein concentration, which are found meaningfully slower than in the non-pored case, as expected for softened membranes characterized by lower values of the mechanical moduli. Furthermore, a systematic dependence of the relaxation rates with the protein concentration is observed in these cases. For the sake of analysis, we compare in Fig. 3d the different cases with the relaxation rates reduced by the value at zero permeability, this is $\omega(\lambda=0) = (\sigma k + \kappa k^3)/4\eta$ calculated by taking the effective values of the mechanical moduli obtained from the static spectra. As expected, for the bare lipid membranes no excess rate is detected. However, for the pored membranes, a clear excess rate is observed increasing with the protein content. Such an excess rate is found with a clear k -dependence, which could be explained by the relaxation rates of the fluctuation modes in the permeable membrane. As expected, increasing values of the permeability coefficient are obtained with increasing protein.

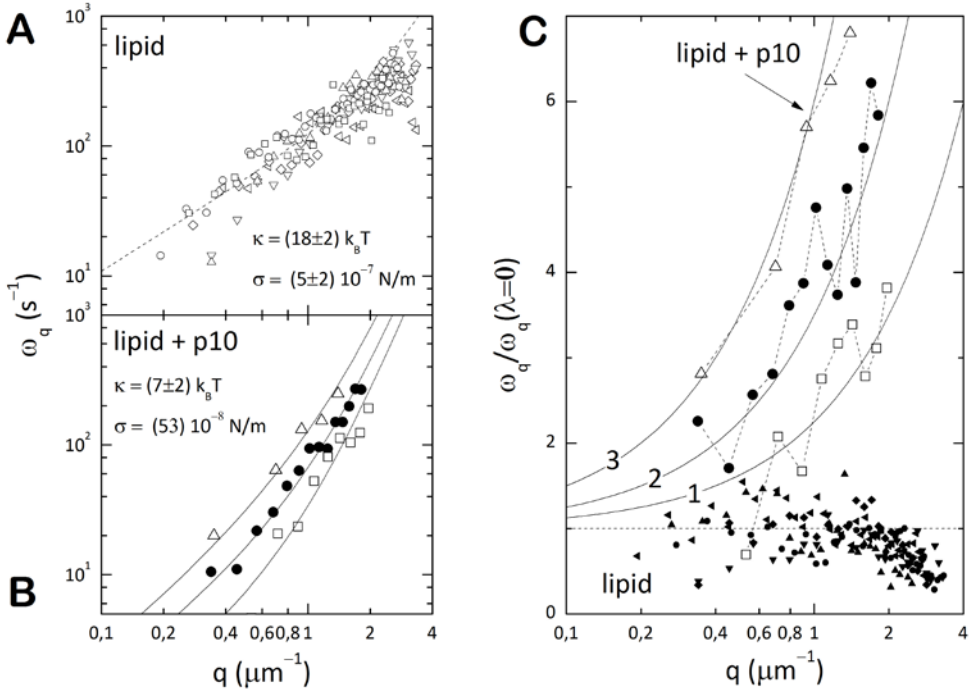


Figure 4. Dynamic results for vesicles with p10 at a ratio P / L 1/37000 exposed to various osmotic gradients (8 mM, 80 mM and 400mM).

Neutron Spin echo in LUVs:

Permeability motions are detected in the intermediate relaxation function. The NSE relaxation functions contain dynamical information occurring at times below 100 ns corresponding to short-range membrane fluctuations (at the NSE window $qR \gg 1$; the probed undulations, $q \approx k_l = l/R$, correspond hence to equatorial modes $l \approx 5$ up to $l \approx 50$). In this regime the mode wavelength is much smaller than the vesicle perimeter ($\lambda = 2\pi/k = 2\pi R/l$), thus bending modes can be described as motions of locally flat bilayers at the continuous approximation intrinsic to the ZG theory. We have plotted in Figure 5 the relaxation rates of the fast mode of the NSE relaxation functions of Fig. 4. Data are represented as a function of q^3 . Linear plots are achieved, as expected for bending modes. Similar plots are obtained for all cases considered in the present study.

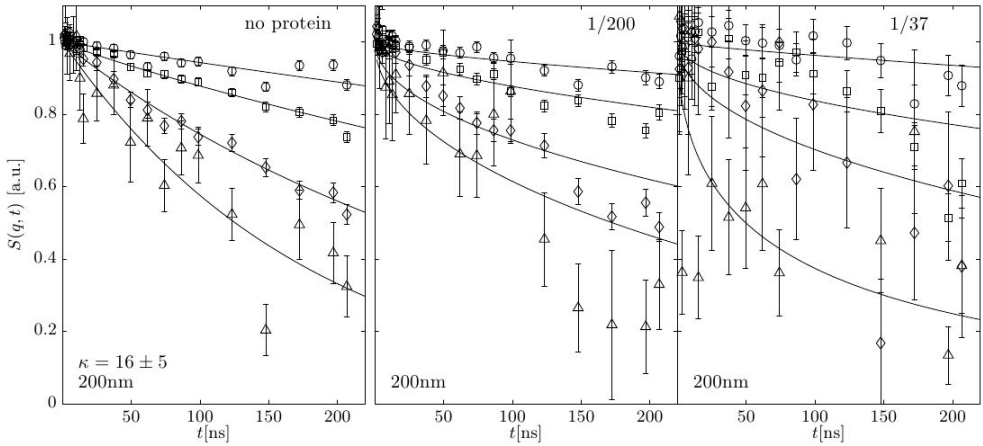


Figure 5. Intermediate relaxation functions for two concentrations of protein compared to control lipid vesicle in the absence of pores.

Discussion

From a microscopic standpoint, upon an elementary event, the membrane is displaced in the normal direction by a distance δ (of the order of the membrane thickness), so the energy involved on the unitary permeability event is $\wp = F_a \delta$. Consequently, the susceptibility coefficient should be related to the elemental force as $\chi = \wp = \rho_0 F_a \delta$. Because the energy involved in such microscopic event is of the order of $\wp = F_a \delta \approx k_B T$, the average energy put in play by the permeability imbalance defines the macroscopic susceptibility per area unit which should take a value of the order of $\chi \approx k_B T \rho_0$.

For instance, the glucose transporter of human erythrocytes is an integral protein

with twelve consecutive hydrophobic helices sequentially distributed along the primary sequence which are separated by disordered domains. Although its detailed *in situ* structure is not known yet, plausible models suggest a lateral side-by-side assembly of the helices into a cylindrical tertiary conformation which globally structures as a barrel-like transmembrane channel. As a plausible transport mechanism, the presence of hydrophilic residues exposed to the inner surface -thus susceptible for hydrogen-bonding with hydrophilic species inside the pore, could catalyze the active motion of glucose as it moves through the channel [4].

While the pores self-assemble very reliably on phospholipid bilayers, the determination of the number of pores *in situ* for liposomes remains difficult. Betz and cols have proposed three independent methods to establish the number of pores on different types of liposomes: (A) the loss of refractive index due to equilibration of the inside and outside buffer conditions, and the loss of volume by (B) membrane aspiration and by (C) membrane tether pulling experiments. With these three methods we are able to determine the pore density on the membrane, and all measurements give similar values; an average pore distance is found on the order of 100 nm.

Even under the form of multimeric self-assembled complexes, such as the portal complex of phi29, protein nanopores are robust, easily obtainable at low cost, and easy to modify with nanotechnological purposes. In particular, pore proteins incorporated to lipid membranes could be used as smart gates for specific solute transport in artificial vesicle-based cargo devices or bioreactors [24, 25]. During recent years, a large number of studies have focused on the use of biological nanopores for diverse applications, from counting single molecules [26] to genome sequence approaches [2]. Indeed, the high specificity of the viral connector for DNA translocation, together with its well known structure [27], makes it an attractive system to bridge material engineering and synthetic structural biology in the context of the use of DNA-nanopores in synthetic tools and devices [11]. Furthermore, the synthetic approach offers unique possibilities for the analysis of the physical mechanisms involved in polymer translocation along pore-like structures.

Conclusions

Acknowledgments

This work was partially supported by grants FIS2012-*****, Consolider Ingenio 2010 CSD2007-0010 from MINECO, S-0505/MAT/0283 from CAM, Thomas. We acknowledge ILL-EU for beamtime (ILL grant #) L.H.M was supported by CSD2007-0010 and I.L-M from NANOBIO-M (grant CAM S-0505/MAT/0283).

Appendix. Zilman-Granek formalism for the dynamic structure factor of the bending fluctuations in the permeability regime.

The ZG theory provide us with the analytic formalism for interpreting the dynamic structure factor corresponding to the membrane fluctuations (7,8). In a continuous description, assuming ergodicity within the thermal modes, $\langle h_q(t)h_q(0) \rangle = \langle h_q^2 \rangle e^{-\gamma(q)t}$ (with $\langle h_q^2 \rangle$ being the rms amplitude and $\gamma(q)$ a relaxation rate), in the ZG formalism the two-point correlation function reads (8):

$$\langle \Delta h^2(r-r', t) \rangle = \frac{1}{2p^2} \iint \langle h_q^2 \rangle \left(1 - e^{iq(r-r')} e^{-g(q)t} \right) d^2q \quad (A1)$$

which is the relevant quantity for the subsequent calculation of the intermediate scattering function of the shape fluctuations observed at a scattering wavevector k , this is (8):

$$S_{fluct}(k, t)/S(k, 0) = \iint \exp \left[-\frac{k^2}{2} \langle \Delta h^2(r-r', t) \rangle \right] dr dr' \quad (A2)$$

In the ZG theory, only the time-dependent component of the two-point correlations is considered in the relevant calculation; a dynamic correlator is defined as (8):

$$f(r-r', t) = \frac{1}{2p^2} \iint \langle h_q^2 \rangle e^{iq(r-r')} \left(1 - e^{-g(q)t} \right) d^2q \quad (A3)$$

in a way such that Eq. (A1) can be re-written as the sum of the two terms, $\langle \Delta h^2(r-r', t) \rangle = \phi_0(r-r') + \phi(r-r', t)$, with $\phi_0(r-r')$ being the static part of the fluctuations. Here, the relevant result concerns to $\phi(r-r', t)$ in Eq. A3, which determine the time dependence of the fluctuation structure factor.

The original ZG theory deals with pure bending fluctuations restored by bending elasticity (κ) and relaxing through bulk friction (which is determined by the bulk viscosity η). For bending thermal modes characterised by exponential correlations $\langle h_q(t)h_q(0) \rangle = \langle h_q^2 \rangle e^{-\gamma(q)t}$, one expects amplitudes varying as $\langle h_q^2 \rangle_{bend} = k_B T / E_z(q)$ (with $E_z(q) = \kappa q^4$ being the transverse component of the elastic energy density tensor), and relaxation rates defined by a q -dependent dispersion, $\gamma_{bend} = (\kappa/4\eta) q^3$. Consequently, after making a variable change ($z = \xi q$) in terms of a characteristic, time-dependent, viscous length, $\xi_\eta = (\kappa t/4\eta)^{1/3}$, the integral in Eq. A3 can be rewritten as follows (8):

$$f_h(r-r', t) = \frac{1}{2p^2} \left[\frac{1}{4} \left(\frac{k_B T}{\kappa} \right)^{1/2} \frac{k_B T}{\eta} t \right]^{2/3} F_h[z(r-r')/\xi_\eta(t)] \quad (A4)$$

where the scaling function $F_\eta[u(t)]$ was defined in ZG (8) as:

$$F_h[u(t)] = \int_0^\infty J_0[u(t)] \frac{1 - e^{-z^3}}{z^3} dz \quad (A5)$$

with $J_0[u(t)]$ being the zero-th order Bessel function of the first kind which is a monotonically decaying function of the dimensionless distance $u(t) = z(r-r')/\xi$.

The scaling function $F_\eta[u(t)]$ can be calculated numerically, although the relevant asymptotic limit can be analytically discussed. Over short distances ($u \rightarrow 0$), the kernel $J_0(u) \approx 1$, thus, the scaling function asymptotically converges to the constant value independent of time, $F_\eta(u \rightarrow 0) \approx 1.34 \sim t^0$ (8). Consequently, the point-to-point correlations are expected with the time dependence arisen from the variable change implicit to Eq. A4. Therefore, for the two-point correlations in rigid membranes governed by bending modes ($\kappa \gg k_B T$; $u \rightarrow 0$), one expects a sub-diffusive trajectory varying with time as (8,9):

$$\langle \Delta h^2(t) \rangle_h \approx f(u \rightarrow 0, t) \approx 0.025 \left[\left(\frac{k_B T}{\kappa} \right)^{1/2} \frac{k_B T}{h} t \right]^{2/3} \quad (A6)$$

Consequently, if one looks at the time dependence of the dynamic structure factor of the bending fluctuations in the viscous dissipation regime, substituting Eq. A6 into Eq. A2, one finds a stretched exponential profile as:

$$S_h(k, t)/S_0 \approx \exp \left[-(\Gamma_{bend} t)^{2/3} \right] \quad (A7)$$

with a viscosity-dominated decay rate:

$$\Gamma_h(k) \approx 0.025 \left(\frac{k_B T}{\kappa} \right)^{1/2} \frac{k_B T}{h} k^3 \quad (A8)$$

This constitutes the major result of the ZG theory, which introduces the sub-diffusive character of the bending fluctuations in rigid membranes as a main feature defining the relaxation of the dynamic structure factor. By considering a generalized hydrodynamic compliance embedded in a generic Oseen tensor $\Lambda(q)$, the ZG formalism could be easily extended to bending modes relaxing through other different dissipation mechanisms. In the case considered here, where bulk friction competes with permeation transport for energy dissipation; in that case, the specific Oseen tensor reads as:

$$\Lambda(q) = \frac{1}{4\eta q} + I \quad (A9)$$

Consequently, the relaxation rate (which is defined as a dynamical ratio of the corresponding restoring force to the energy dissipation -characterized by the Oseen tensor) can be expressed as:

$$g_{bend}(q) = \Lambda(q) E_z(q) = \frac{kq^3}{4h} (1 + 4hl q) \quad (A10)$$

which reduces to the usual value in the viscous frictional regime, $\gamma_{bend} \approx \kappa q^3/4\eta$ (at low permeability $\lambda \ll (4\eta q)^{-1}$).

However, in viscous solvents, if the membrane permeability is high enough, the bending modes relax as $\gamma_{bend} \approx \kappa \lambda q^4$ (if $4\eta \lambda q \gg 1$). In that case, the system predominantly dissipates energy through permeation transport, which becomes a more compliant dissipative process than bulk friction. Such a permeability regime is naturally dominant at high wavevectors, where a renormalized dispersion $\gamma \sim q^4$ is expected for the relaxation rates of the bending modes with respect to the usual $\gamma \sim q^3$ scaling. Consequently, for bending modes dissipating energy in the permeability regime, the time-dependent component of the two-point correlations re-writes as follows:

$$f_1(r-r', t) = \frac{1}{2p^2} \iint \frac{k_B T}{k q^4} e^{iq(r-r')} [1 - \exp(-\kappa l q^4 t)] d^2 q \quad (A11)$$

In this case, performing the relevant change of variable ($z = \xi_\lambda q$ with $\xi_\lambda = (\kappa \lambda t)^{1/4}$), the dynamic correlator is expected with the sub-diffusive form:

$$f_1(r-r', t) = \frac{1}{2p^2} \left[\frac{k_B T}{k} (k_B T l) t \right]^{1/2} F_1 [z(r-r')/x_1(t)] \quad (A12)$$

with the corresponding scaling function $F_\lambda[u(t)]$ defined in this case as:

$$F_1[u(t)] = \int_0^\infty J_0[u(t)] \frac{1 - e^{-z^4}}{z^3} dz \quad (A13)$$

Assuming identical conditions as those considered by ZG in the viscous dissipation regime, the present scaling function can be also calculated numerically in the high- q dynamic scale ($u \rightarrow 0$; $J_0(u) \approx 1$). From the numerical calculation, one obtains a time independent asymptote taking a constant value $F_\lambda(u \rightarrow 0) \approx 0.886 \sim t^0$. Consequently, if one looks at the dynamic structure factor of the bending fluctuations in the permeation regime, substituting the new results into Eq. A2, one finds a stretched exponential profile as:

$$S_1(k, t)/S_0 \approx \exp\left[-(\Gamma_1 t)^{1/2}\right] \quad (A14)$$

with a permeability-controlled decay rate:

$$\Gamma_1(k) \approx 0.045 \left(\frac{k_B T}{k} \right) (k_B T l) k^4 \quad (A15)$$

This result represents the natural extension to permeability-mediated dissipation of

the ZG theory of the dynamic structure factor of the bending fluctuations in the rigid membrane. Similarly to the ZG-case of pure viscous dissipation (stretching exponent $\beta_\eta = 2/3$, dynamic scaling $\Gamma_\eta \sim k^3$), the theory above also predicts a sub-diffusive relaxation defined by a small stretching exponent ($\beta_\lambda = 1/2$) and relaxation rates characterized by $\Gamma_\lambda \sim k^4$ scaling. Intermediate relaxation regimes are expected from hybrid dissipation ($\lambda \approx (4\eta q)^{-1}$); in those cases, the dynamic parameters should take intermediate values $\beta = 2/\nu$ and $\Gamma \sim k^\nu$ with the exponent ν varying in the range $3(\eta) > \nu > 4(\lambda)$.

References

1. Alberts, B., et al., *Introducción a la Biología Celular / Essential Cell Biology*. 2011: Editorial Medica Panamericana Sa de.
2. Wallace, E.V., et al., *Identification of epigenetic DNA modifications with a protein nanopore*. Chem Commun, 2010. 46(43): p. 8195-7.
3. Houslay, M.D. and K.K. Stanley, *Dynamics of biological membranes: influence on synthesis, structure, and function*. 1982: Wiley.
4. Lipowsky, R. and E. Sackmann, *Structure and Dynamics of Membranes: I. From Cells to Vesicles / II. Generic and Specific Interactions*. 1995: Elsevier Science.
5. Nelson, D.D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2013: W.H. Freeman.
6. Boal, D. and D.H. Boal, *Mechanics of the Cell*. 2012: Cambridge University Press.
7. Bustamante, C., Z. Bryant, and S.B. Smith, *Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics*. Nature, 2003. 421(6921): p. 423-7.
8. Boal, D.H., *Mechanics of the Cell*. 2002: Cambridge University Press.
9. Valpuesta, J.M. and J.L. Carrascosa, *Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging*. Quarterly Reviews of Biophysics, 1994. 27(02): p. 107-155.
10. Guasch, A., et al., *Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage ϕ 29 connector particle*. Journal of Molecular Biology, 2002. 315(4): p. 663-676.
11. Moleiro, L.H., et al., *Efficient Orthogonal Integration of the Bacteriophage ϕ 29 DNA-Portal Connector Protein in Engineered Lipid Bilayers*. ACS Synthetic Biology, 2012. 1(9): p. 414-424.
12. Faucon, J.F., et al., *Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements*. J. Phys. France, 1989. 50(17): p. 2389-2414.
13. Méléard, P., L.A. Bagatolli, and T. Pott, *Chapter 9 - Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: From Lipid Mixtures to Native Membranes*

- Under Physiological Conditions*, in *Methods in Enzymology*, D. Nejat, Editor. 2009, Academic Press. p. 161-176.
14. Manneville, J.B., et al., *Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration*. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2001. 64(2 Pt 1): p. 24.
 15. Helfrich, W., *Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments*. *Z Naturforsch C*, 1973. 28(11): p. 693-703.
 16. Angelova, M.I., et al., *Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications*, in *Trends in Colloid and Interface Science VI*, C. Helm, M. Lösche, and H. Möhwald, Editors. 1992, Steinkopff. p. 127-131.
 17. Mathivet, L., S. Cribier, and P.F. Devaux, *Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field*. *Biophysical Journal*, 1996. 70(3): p. 1112-1121.
 18. Patty, P.J. and B.J. Frisken, *Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data*. *Appl Opt*, 2006. 45(10): p. 2209-16.
 19. Patty, P.J. and B.J. Frisken, *The Pressure-Dependence of the Size of Extruded Vesicles*. *Biophysical Journal*, 2003. 85(2): p. 996-1004.
 20. Frisken, B.J., C. Asman, and P.J. Patty, *Studies of Vesicle Extrusion*. *Langmuir*, 1999. 16(3): p. 928-933.
 21. Arriaga, L.R., et al., *Stiffening Effect of Cholesterol on Disordered Lipid Phases: A Combined Neutron Spin Echo + Dynamic Light Scattering Analysis of the Bending Elasticity of Large Unilamellar Vesicles*. *Biophysical Journal*, 2009. 96(9): p. 3629-3637.
 22. Lesieur, S., et al., *Size analysis and stability study of lipid vesicles by high-performance gel exclusion chromatography, turbidity, and dynamic light scattering*. *Anal Biochem*, 1991. 192(2): p. 334-43.
 23. Schleger, P., et al., *The sub-neV resolution NSE spectrometer IN15 at the Institute Laue-Langevin*. *Physica B: Condensed Matter*, 1999. 266(1-2): p. 49-55.
 24. Cuervo, A. and J.L. Carrascosa, *Viral connectors for DNA encapsulation*. *Curr Opin Biotechnol*, 2012. 23(4): p. 529-36.
 25. Reisner, D.E., *Bionanotechnology: Global Prospects*. 2008: Taylor & Francis.
 26. Wendell, D., et al., *Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores*. *Nature nanotechnology*, 2009. 4(11): p. 765-772.
 27. Zilman, A.G. and R. Granek, *Membrane dynamics and structure factor*. *Chemical Physics*, 2002. 284(1-2): p. 195-204.

